

**Aufbau eines Radioimmunoassays
für das lipotrope Peptid B
aus Schweinehypophysen**

Gertraud Neureuther

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof.Dr.med.H.SCHWIEGK

Aufbau eines Radioimmunoassays für das lipotrope Peptid B
aus Schweinehypophysen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gertraud Neureuther

aus

Marktoberdorf

1975

Mit Unterstützung des SFB 51 (C19)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.med.P.SCHWANDT

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.H.SCHWIEGK

Dekan: Prof.Dr.med.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 23.3.1976



Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Priv.Doiz.Dr.med.P.SCHWANDT in der Zeit von März 1974 bis September 1975 an der I. Medizinischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof.Dr.med.H.SCHWIEGK) durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielseitigen Anregungen und die Unterstützung bei der Arbeit danke ich Herrn Priv.Doiz.Dr.med.P.SCHWANDT und seinen Mitarbeitern.

Inhaltsverzeichnis

- 1 Einleitung und Fragestellung
- 2 Peptid B-Charakterisierung
 - 2.1 Präparation
 - 2.2 physikalisch-chemische Charakterisierung
 - 2.3 Testung auf andere Hormonaktivitäten
 - 2.4 Andere biologische Wirkungen
- 3 Antikörper gegen Peptid B
 - 3.1 Immunisierungsmethoden
 - 3.1.1 Immunisierung nach DESRANLEAU
 - 3.1.2 Immunisierung nach PLAYFAIR
 - 3.1.3 Immunisierung nach NIXON
 - 3.2 Behandlung der Antiseren
 - 3.3 Austestung der Bindungsfähigkeit der Antiseren
- 4 Markierung von Peptid B mit Jod¹²⁵
 - 4.1 Markierungsreaktion
 - 4.2 Auftrennung des Markierungsgemisches
 - 4.3 Rechromatographie
 - 4.4 Austestung der Immunoreaktivität der Fraktionen
 - 4.5 Berechnung der spezifischen Aktivität
- 5 Elektrophoresen des markierten Peptides
 - 5.1 Methode der Papierelektrophorese
 - 5.2 Kontrollelektrophorese des Markierungsgemisches
 - 5.3 Versuch der Darstellung des beschädigten Peptides
 - 5.4 Analytische Acrylamidgelelektrophorese
- 6 Aufstellung von Standardkurven
 - 6.1 Standardkurven in Puffer
 - 6.2 Wiederfindekurven in Schweineserum

- 7 Inkubationsmethoden
 - 7.1 Versuchsdurchführung
 - 7.2 Ergebnisse

- 8 Trennung von freiem und antikörpergebundenem Antigen
 - 8.1 Doppelantikörpermethode mit Filtertrennung
 - 8.1.1 zweiter Antikörper
 - 8.1.2 Pipettierplan
 - 8.1.3 Trennmethode
 - 8.2 Doppelantikörpermethode mit Zentrifugentrennung
 - 8.3 Trennung mit dextranbeschichteter Kohle
 - 8.4 Trennung mit Polyäthylenglykol

- 9 Berechnungen zum Assay

- 10 Einflüsse auf die Empfindlichkeit des Assays
 - 10.1 Antiserum
 - 10.2 markiertes Antigen
 - 10.2.1 spezifische Aktivität und Qualität
 - 10.2.2 Konzentration
 - 10.2.3 Aufbewahrung des Tracers

- 11 Spezifität des Assays
 - 11.1 Methode
 - 11.2 untersuchte Hormone und Ergebnisse

- 12 Messungen in biologischem Material
 - 12.1 Bestimmung des Peptid B-Gehaltes von Schweineseren
 - 12.2 Hypophysenextrakte

- 13 Diskussion

- 14 Zusammenfassung

Häufig verwendete Reagenzien:

Puffer I: 0.06 M Barbital-HCl-Puffer
 0.5 % Rinderserum-Albumin (BSA)
 0.02 % Natriumazid
 pH 8.6

Puffer III: 0.06 M Barbital-HCl-Puffer
 5 % % BSA
 0.02 % Natriumazid
 pH 8.6

Einleitung und Fragestellung

Aus Hypophysen mehrerer Spezies wurden verschiedene lipolytisch wirksame Peptide isoliert, die sich von den bekannten Hypophysenhormonen unterscheiden (8, 47). Obwohl zahlreiche Untersuchungen über ihre biologischen Wirkungen vorliegen, sind gegenwärtig noch keine Aussagen über die physiologische Bedeutung der Lipotropine möglich.

1972 wurde von DESRANLEAU et al. (13) für ovine- β -Lipotropic Hormone (α - β -LPH) ein empfindlicher und spezifischer Radioimmunoassay beschrieben, der allerdings nur in einem Konzentrat aus 200 ml Schafserum den Nachweis von ca. 10 ng/ml α - β -LPH erlaubte. Kürzlich berichteten GILKES et al. (17) über einen Radioimmunoassay für β -Human-Melanocytenstimulierendes Hormon (β_h -MSH), der so starke Kreuzreaktionen mit γ_h -LPH und β_h -LPH zeigt, daß damit eine Messung der Lipotropine in Plasmaextrakten möglich ist.

Um der Frage nach der physiologischen Funktion der Lipotropine nachgehen zu können, bestand die Zielsetzung dieser 1974 begonnenen Arbeit darin, gegen das von unserer Arbeitsgruppe aus Schweinehypophysen isolierte Peptid B (45, 46, 52) ein Antiserum zu erzeugen, damit eine radioimmunologische Nachweismethode aufzubauen und diese auf ihre Spezifität hin zu untersuchen. Weiter sollten erste Messungen im Serum die Grundlage bilden für Untersuchungen zur Kinetik der Lipotropinsekretion.

Peptid B-Charakterisierung

2.1 Präparation

Schweinehypophysen werden unmittelbar nach dem Schlachten entnommen und eingefroren. Zur Weiterverarbeitung werden sie portionsweise aufgetaut, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und lyophilisiert. Der Rohextrakt (Fraktion G) wird gewonnen durch alkalische Salzfällung und schrittweise saure Acetonextraktion und auf einer CM-C-25-Sephadex-Säule vorgereinigt (42). Die weitere Reinigung erfolgt mit Hilfe der präparativen Polyacrylamidgelelektrophorese (Fraktion F) sowie durch Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 (Peptid B) (41). Sämtliche Reinigungsschritte wurden in der analytischen Acrylamidgelelektrophorese und im Bioassay überprüft.

2.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung

Das Molekulargewicht von Peptid B wurde bestimmt

mit der Ultrazentrifuge:	11 400
mit der SDS-Elektrophorese:	11 500
mit der Gelfiltration:	10 000 bis 12 000

Der isoelektrische Punkt ist 4,39. Es wurden keine freien SH-Gruppen nachgewiesen. Die N-terminale Aminosäure ist Alanin. Die Glykoprotein-Reaktion ist negativ.

Die Prüfung der Einheitlichkeit erfolgte mit der analytischen Ultrazentrifuge, säulenchromatographisch (Gelfiltration, verschiedene Anionen- und Kationenaustauscher), mit der analytischen Acrylamidgelelektrophorese bei pH 8,3 und 4,5 sowie durch Kontrolle der N-terminalen Aminosäure.

2.3 Testung auf andere Hormonaktivitäten

Peptid B wurde im Bioassay und Radioimmunoassay auf andere Hypophysenhormonaktivitäten untersucht (47):

Tabelle 1

	Bioassay	Radioimmunoassay
ACTH	0,0013 U/mg	1 ng/10 µg
TSH	25 mU/mg	< 1: 5.000
MSH	1,3 · 10 ⁴ U/g	-
ADH	∅	-
FSH	-	< 1:10.000
PRL	-	< 1: 1.000
LH	-	< 1: 5.000

2.4 Andere biologische Wirkungen

Die biologische Wirkung von Peptid B wurde in vitro und in vivo untersucht (54). Die lipolytische Wirkung in vitro ist als die minimale effektive Dosis (MED) angegeben, bestimmt aus der Logarithmusdosis-Wirkungskurve der freien Fettsäuren, bei der Maus aus der des freien Glycerins.

Tabelle 2

Spezies	MED in µg/ml	MED in pM/ml
Kaninchen	0,06	5,3
Ratte	1,1	96,8
Maus	1,37	120,6
Meerschweinchen	2,63	231,4

Im subkutanen Fettgewebe von Miniaturschweinen konnte keine lipolytische Aktivität gemessen werden.

Die in vivo-Aktivität wurde am Kaninchen untersucht. Nach intravenöser Injektion von 50 µg Peptid B pro kg Körpergewicht erreichten die freien Fettsäuren und das freie Glycerin die höchsten Werte nach 30 Minuten, der Insulinspiegel 60 Minuten nach der Injektion; die Blutglucose stieg bis zum Abschluß der Messungen nach 4 Stunden kontinuierlich an.

Antikörper gegen Peptid B

3.1 Immunisierungsmethoden

Für alle Injektionen des unkonjugierten Peptids wurden nur Präparationen verwendet, die in der analytischen Acrylamidgelelektrophorese und in der Analyse der N-terminalen Aminosäure einheitlich waren.

Immunisiert wurden zum Teil Albino-Kaninchen, zum Teil Grauscheck-Kaninchen, irgendein rassebedingter Unterschied in der Reaktion auf die Immunisierung konnte nicht festgestellt werden.

Bisher wurden die drei folgenden Methoden angewendet:

3.1.1 Immunisierung nach DESRANLEAU et al. [11]

n = 4

1 mg Peptid B wurde in 1 ml Emulsion aus komplettem Freund'schem Adjuvans (Fa. Difco Lab., Detroit/USA) und physiologischer Kochsalzlösung (4:1) in alle 4 Fußsohlen gespritzt. Diese Injektionen wurden nach einer Woche wiederholt und anschließend in einwöchigen Abständen für weitere 4 Wochen intramuskulär fortgeführt.

9 Wochen nach Immunisierungsbeginn wurde den Kaninchen aus der Ohrrendvene Blut abgenommen und das Serum auf seinen Antikörpergehalt geprüft. Mit dieser Immunisierungsmethode hatten alle 4 Tiere bei einer Verdünnung von 1 : 50 nachweisbare Antikörper gebildet. Den Kaninchen mit den besten Titern wurden in unregelmäßigen Abständen 0,25mg Peptid in physiologischer Kochsalzlösung subkutan injiziert, der Antikörpertiter konnte damit erhalten, in einem Fall noch verbessert werden.

Ein Kaninchen wurde über mehrere Monate ohne festes Schema - vor allem abhängig von der Menge des zur Immunisierung vorhandenen Antigens und der Möglichkeit, das Serum sofort auf seinen Titer auszutesten - subkutan weiterimmunisiert. Abb. 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Booster-Injektionen und des nachgewiesenen Bindevermögens in diesem Serum Nr. XXII.

3.1.2 Immunisierung nach PLAYFAIR (36)

n = 14

Je Kaninchen wurden 100 µg Peptid B in 5 ml Emulsion aus komplettem Freund'schem Adjuvans und physiologischer Kochsalzlösung (2:1) an etwa 25 Stellen intracutan injiziert; 8 Wochen später wurde den Tieren Blut abgenommen und der Antikörpergehalt geprüft. Bei drei Kaninchen waren bei einer Verdünnung von 1:10 Antikörper in geringem Maße nachweisbar, der Titer war auch bei Kontrollen in den folgenden Wochen nicht höher.

Die drei sensibilisierten Kaninchen wurden 5 Monate nach der Grundimmunisierung mit je 100 µg Peptid B in physiologischer Kochsalzlösung intravenös geboostert, einen Monat später wurden die multiplen intracutanen Injektionen wie am Anfang wiederholt. Bei einem Kaninchen stieg der Antikörpertiter deutlich an (Nr. XII in Abb. 2).

3.1.3 Immunisierung nach NIXON (35)

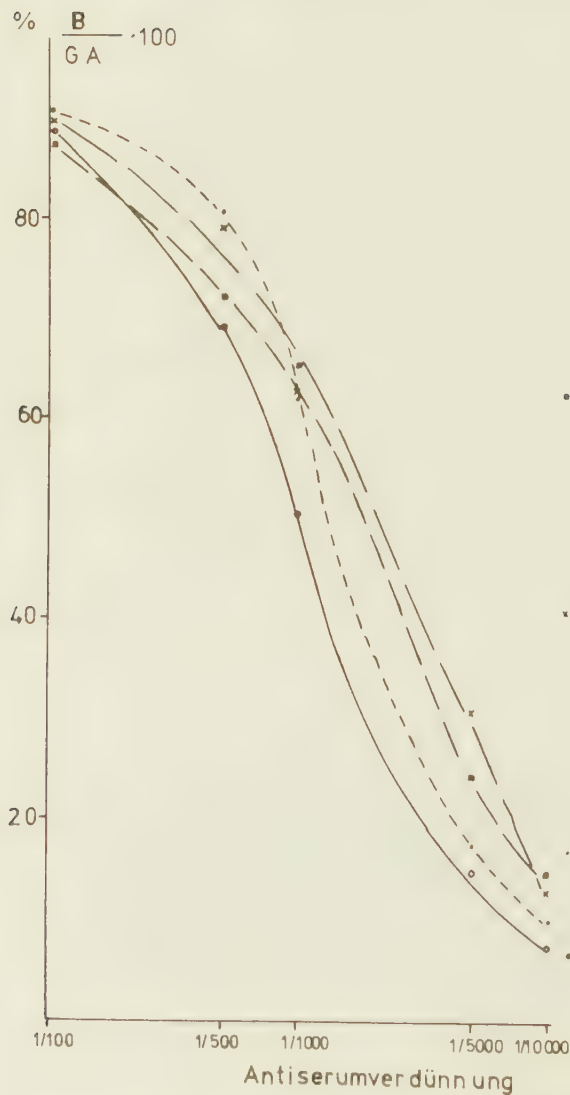
n = 3

Jedes Kaninchen wurde mit 250 µg Peptid B in 3 ml Emulsion aus komplettem Freund'schem Adjuvans und physiologischer Kochsalzlösung (1:4) an 6 Stellen subcutan immunisiert, die Injektionen wurden zweimal in monatlichen Abständen mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans wiederholt. Zwei Kaninchen bildeten Antikörper, doch ließ die Bindungsfähigkeit dieser Seren in der Verdünnungsreihe sehr stark nach, vgl. Serum Nr. VIII in Abb. 2.

Immunisierungs- und Titerverlauf für Kaninchen Nr. XXII

Blutab-
nahmen

% $\frac{B}{G \cdot A} \cdot 100$



1mg, Pfoten
1mg, Pfoten
1mg, s.c., i.m.
1mg, s.c., i.m.
1mg, s.c., i.m.
1mg, s.c., i.m.

Beginn

1 →

12. Wo.

2 →

16. Wo.

20. Wo.

3 →

24. Wo.

4 →

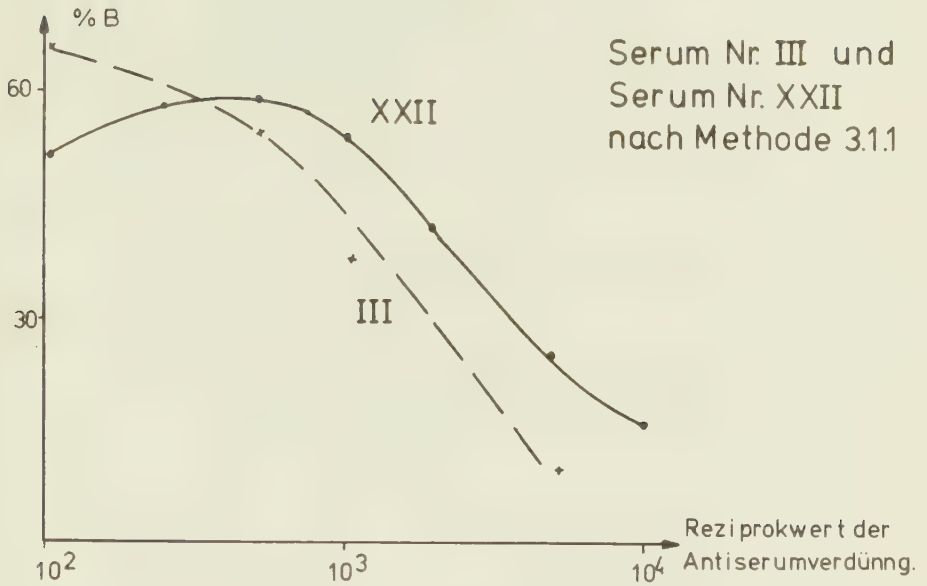
28. Wo.

5 →

32. Wo.

Abb. 1

Verdünnungskurven von Antiseren



Serum Nr. XII
nach Methode 3.1.2

Serum Nr. VIII
nach Methode 3.1.3

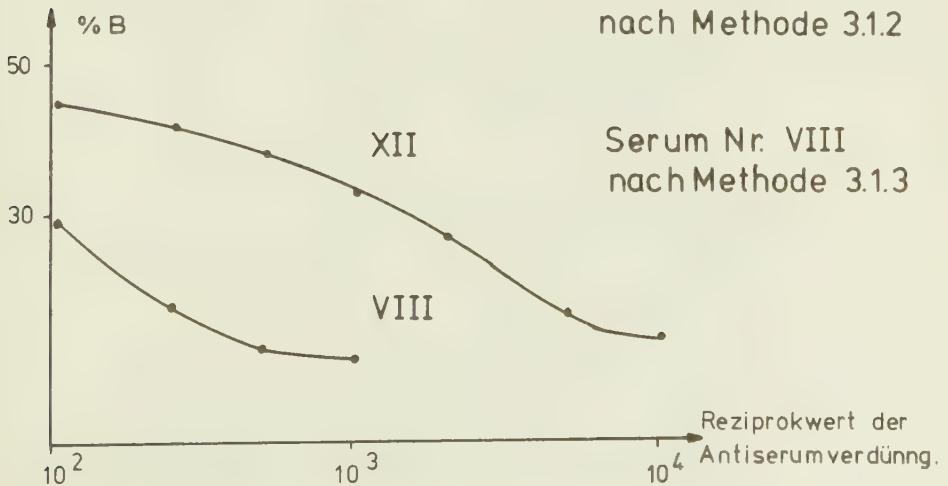


Abb. 2

3.2 Behandlung der Antiseren

Den Kaninchen wurde zur Überprüfung des Antikörpertiters jeweils etwa 5 ml Blut aus der Ohr- und Randvene entnommen, das Serum nach der Gerinnung sofort abzentrifugiert und bei -20°C in 1 ml-Portionen eingefroren. Bei gutem Titer wurden 30 - 50 ml Blut aus der Ohrarterie gewonnen, die Tiere wurden schließlich durch Herzpunktion entblutet.

3.3 Austestung der Bindungsfähigkeit der Seren

Folgende Geräte und Reagenzien wurden verwendet:*

Gammazähler LKB Wallac
(Fa. LKB Producter AB, Stockholm / Schweden)

Teleprint 390
(Teletype Corporation, Skokie, Ill./USA)

beide Leihgaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft,
SFB 51 (C-19)

Zentrifugen Typ UJ 3 und UJ 1 X
(Fa. Christ, Osterode)

Potentiometer Typ 111
(Fa. Püsl, München)

Elektrische Saugpumpe Nr. 4150 411
(Fa. Eppendorf-Gerätebau, Hamburg)

Dosierer Nr. 5231
(Fa. Eppendorf-Gerätebau, Hamburg)

Reaktionsgefäße Nr. 3810
(Fa. Eppendorf-Gerätebau, Hamburg)

Polystyrolröhrchen, 12 x 75 mm
(Fa. Boll, München)

Eppendorfpipetten in versch. Größen 5 - 500 μl
(Fa. Eppendorf-Gerätebau, Hamburg)

Barbital-HCl-Puffer, 0,06 M, pH 8,6

Rinder-Serum-Albumin (BSA) lyophilisiert, Fraktion V,
Nr. 8076
(Fa. Roth, Karlsruhe)

Natriumazid, Bestell-Nr. 6688 (Merck 6688)
(Fa. Merck, Darmstadt)

* Soweit keine Firmenangaben gemacht worden sind, wurden die Reagenzien von der Apotheke der Universitätskliniken München hergestellt.

Puffer für Verdünnungen und Proben (Puffer I) (13)

Barbital-HCl-Puffer 0,06 M, pH 8,6
0,5 % Rinder-Serum-Albumin
0,02 % Natriumazid
endgültiger pH 8,6

Dieser Puffer wird für alle Reaktionen, Verdünnungen und Elutionen verwendet, wenn nichts anderes angegeben ist.

Aktivkohle Norit A pract. Partikelgröße 4 - 5 μ
Bestell-Nr. 30 890 (Serva 30 890)
(Fa. Serva, Heidelberg)

Dextran purum, MG 70.000, Nr. 31390
(Fa. Fluka, Buchs/Schweiz)

Barbital-Natrium, Merck 6318

Natriumazetat, Merck 6287

Natrium-Chlorid, Merck 6408

Puffer für Kohle-Dextran-Suspension (Puffer II) (28)

1,47 g Barbital-Natrium
0,097g Natriumazetat
1,0 g Natriumazid
9,0 g Natrium-Chlorid
ad 1.000 ml aqua dest, pH 7,4

Parafilm in Rollen
(American Can Comp. Nehan, Wisconsin/USA)

Cornwallsspritze 2 ml
(Becton, Dickinson a. Comp., Rutherford, N.J./USA)

Die orientierende Austestung der Antiseren wurde mit der Kohle-Dextran-Trennung durchgeführt, die im Kapitel 8.3 ausführlich beschrieben wird. Es wurden Dreifachproben nach folgendem Schema pipettiert:

100 μ l Verdünnung von markiertem Peptid B
(Beschreibung im Kapitel 4.4)

400 μ l Puffer I

100 μ l Antiserum in folgenden Verdünnungsstufen:
1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 250, 1 : 500,
1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 5000, 1 : 10.000.

Als Verdünnungsmittel wurde Puffer I benutzt.

Die Proben werden in Polystyrolröhrchen 2 Tage bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann werden 0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension dazupipettiert, die Röhrchen im Ständer geschüttelt und sofort 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und der

Anteil des nicht gebundenen Tracers im Kohlerückstand im Gammazähler bestimmt. Das Ergebnis wird als Prozent der gebundenen Aktivität (% B) angegeben. Bei jedem Versuch werden drei Werte ohne Antiserum mitbestimmt, die unspezifische Bindung N beträgt 4 - 10 % der Gesamtaktivität.

In Abb. 2 sind die Verdünnungskurven (37, 38) einiger Antiseren dargestellt mit der Angabe der Immunisierungsmethode.

Abb. 3 zeigt Standardkurven mit den drei besten vorhandenen Antiseren. Die Einzelheiten der Aufstellung der Standardkurven sind in Kapitel 6 erläutert. Das Antiserum Nr. XII, das in keiner Verdünnung einen steilen Abfall der Bindungsfähigkeit zeigt (Abb. 2), ergab überraschenderweise eine empfindlichere Standardkurve als das Antiserum Nr. III, dessen Verdünnungskurve wesentlich steiler verläuft. In der Abbildung sind die eingesetzten Verdünnungen der Antiseren angegeben.

Die Avidität des Serums Nr. XXII wurde nach einem Vorschlag von FELBER (16) überprüft. Für den Versuch (Abb. 4) wurde zur Antiserumverdünnungskurve eine Probe von 5 ng/ml unmarkiertem Peptid B gegeben. Mit dieser Konzentration im mittleren Meßbereich des Assays ist eine deutliche Trennung der beiden Kurven zu erzielen.

4

Markierung von Peptid B mit Jod¹²⁵

4.1

Markierungsreaktion

Geräte und Reagenzien:

Digitaler Strahlenmeßplatz MS Str. 610/1
(Fa. Telefunken)

LKB 7.000 A Ultro Rac-Fraktionssammler
(Fa. LKB-Producter AB, Stockholm / Schweden)

Jod¹²⁵ zur Eiweißmarkierung in alkalischer Lösung ohne Reduktionsmittel, Nr. 5006
(Behringwerke, Frankfurt/Main)

Standardkurven mit verschiedenen Antiseren

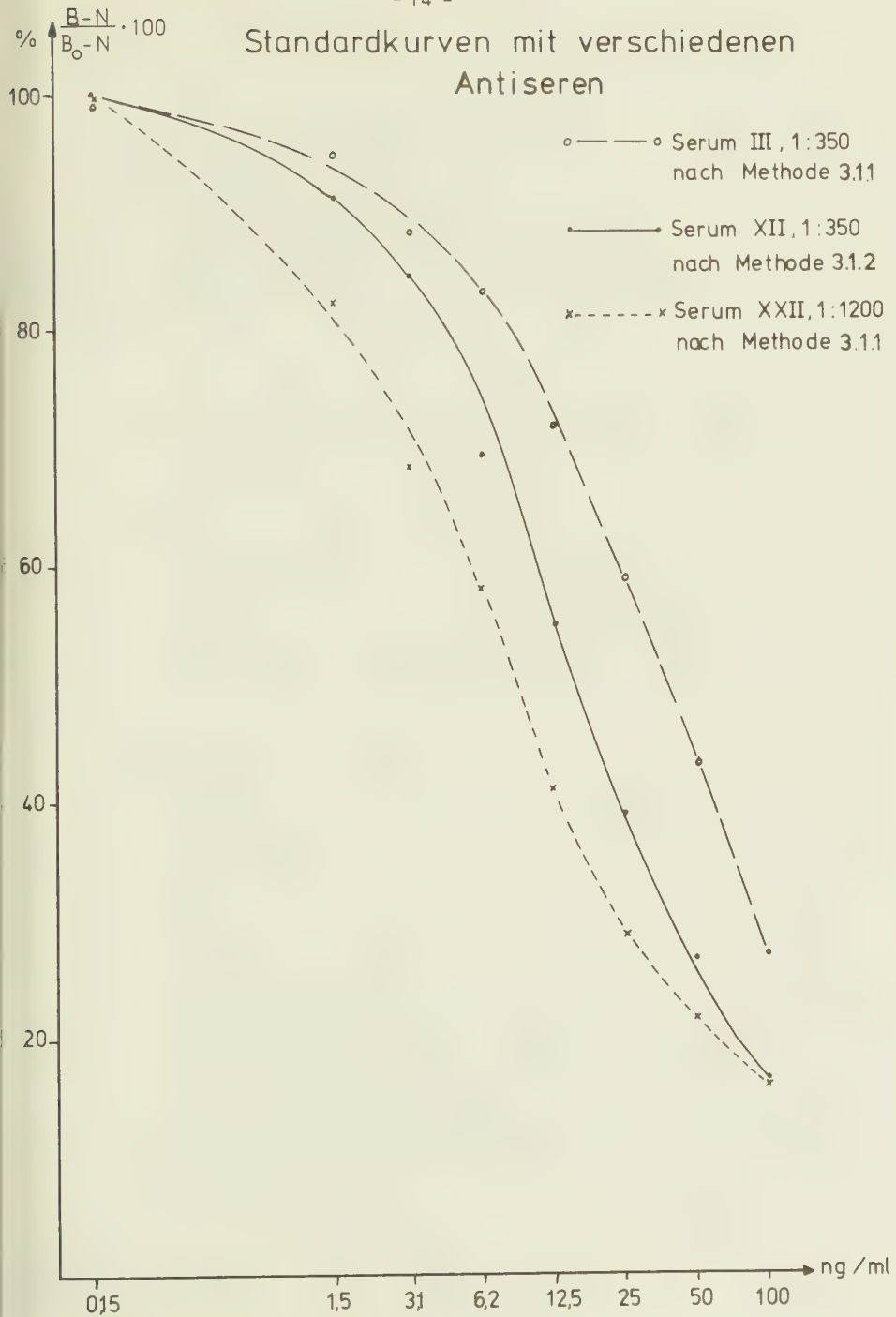


Abb. 3

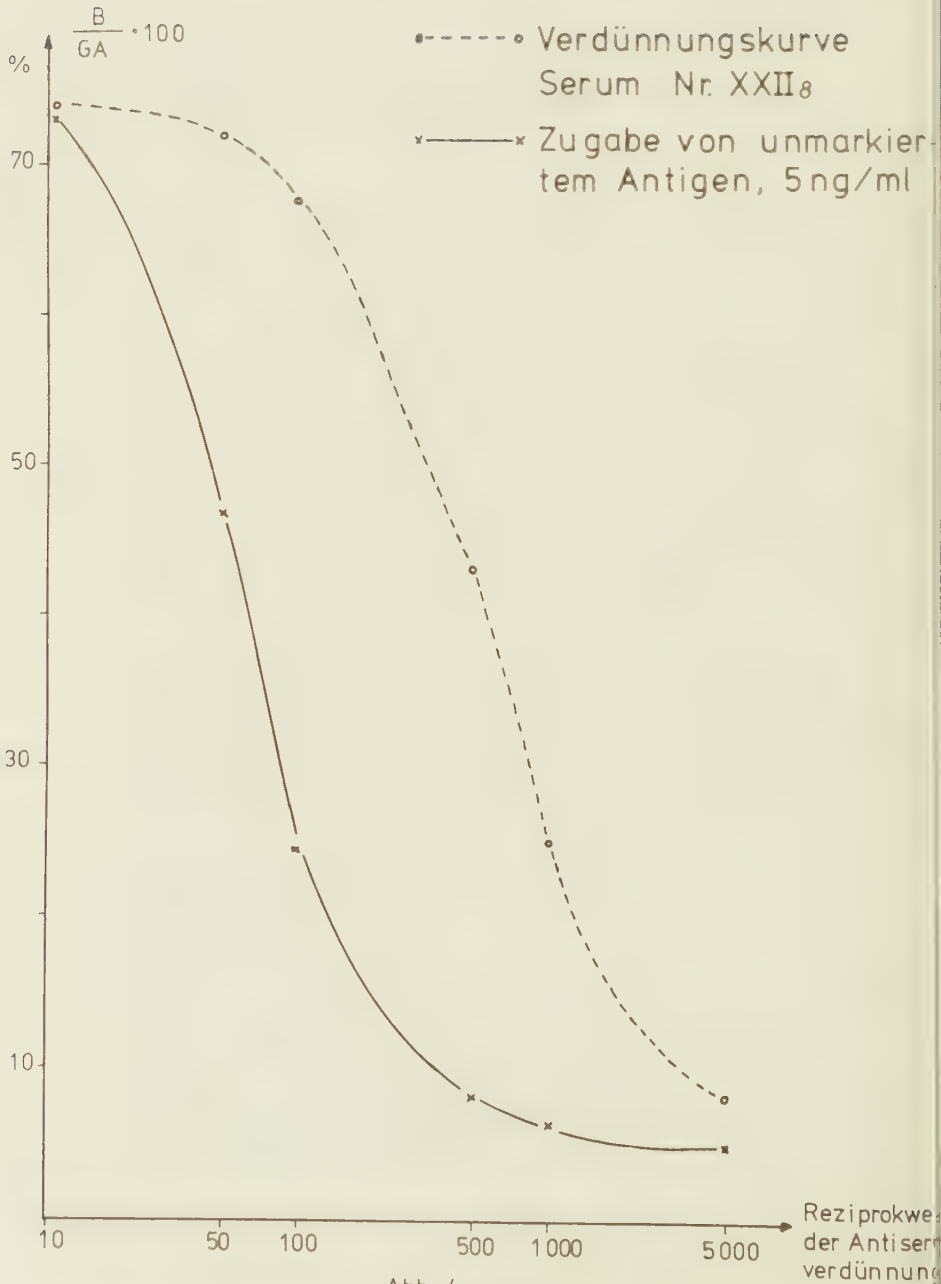


Abb. 4

Natriumhydrogenphosphat, Merck 6580
Natriumphosphatpuffer 0,05 M, pH 7,5
Chloramin T, Merck 2426
Natriumdisulfit, Merck 6528
Siliclad, Kat.Nr. 1950
(Fa. Clay Adams, Parsipanny, N.Y./USA)
Puffer III: Barbitol-HCl-Puffer 0,06 M
5 % Rinder-Serum-Albumin (BSA)
0,02 % Natriumazid
pH 8,6

sonst wie unter 3.3 angegeben.

Die Markierung des Peptides wird nach der Chloramin T-Methode von HUNTER und GREENWOOD (19) durchgeführt nach Mengenangaben von HUNTER (24).

Als Reaktionsgefäß wird das V-förmige Glas verwendet, in dem das Jod¹²⁵ geliefert wird; wenn die gelieferte Aktivität für mehrere Markierungen verwendet werden soll, wird das Jod¹²⁵ mit 0,5 M Natriumphosphatpuffer verdünnt und in silikonisierte Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert, in denen dann die Markierung erfolgt.

Das Glas mit dem radioaktiven Jod wird nach der Lieferung 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Messung der Aktivität vor der Markierung und der Restaktivität im Gefäß und an den verwendeten Pipettenspitzen erfolgt am Geigerzähler.

Außer dem 0,5 M Natrium-Phosphatpuffer, der als gesättigte Lösung im Kühlschrank aufbewahrt wird, stellen wir alle Lösungen unmittelbar vor der Markierung her, zuletzt wird das Chloramin T gelöst. Alle Lösungen für die Markierungsreaktion werden mit Eppendorf-Mikropipetten pipettiert. Seit einiger Zeit lösen wir das Peptid B vor jeder Markierung frisch, da wir die Beobachtung gemacht haben, daß mit gelöst eingefrorenem Peptid die Ausbeute im markierten Peptidpeak sehr unregelmäßig war.

Markierungsreaktion:

2 mCi	Jod ¹²⁵ in etwa 4 µl alkalischer Lösung
20 µl	Natrium-Phosphatpuffer, 0,5 M, pH 7,5
5 µg	Peptid B in 10 µl physiologischer Kochsalz- lösung
100 µg	Chloramin T in 20 µl Natrium-Phosphatpuffer, 0,05 M, pH 7,5
Reaktionszeit 60 Sekunden unter vorsichtigem Schütteln	
240 µg	Natrium-Metabisulfit in 1 ml Natriumphosphat- puffer, 0,05 M, pH 7,5

Vom Markierungsgemisch werden 5 µl abpipettiert und zu 50 µl Puffer III gegeben zur späteren Kontroll-elektrophorese.

Nach diesem Schema wurden 7 Markierungen durchgeführt, die erzielte spezifische Aktivität lag zwischen 120 und 325 µCi/µg, die Jodaufnahme betrug im Durchschnitt 44,7 %, die Grenzwerte waren 26,6 % und 80,2 %.

Um die Markierung schonender durchzuführen und eine relativ niedrige spezifische Aktivität zu erzielen, wurden abweichend vom angegebenen Schema die Reaktionszeit verkürzt, die Peptidmenge erhöht, die Chloramin T-Menge erniedrigt und zum Markierungsgemisch 5 % BSA-Puffer gegeben. Eine Erniedrigung der Chloramin T-Menge auf ein Viertel (12,5 µg je mCi), die Verdoppelung der Peptidmenge (5 µg je mCi) und die Reduktion der Reaktionszeit auf 20 Sekunden brachten gleichmäßige Ergebnisse zwischen 100 und 125 µCi/µg.

4.2 Auftrennung des Markierungsgemisches

Geräte und Reagenzien:

Sephadex G-25 medium und G-50 superfine
(Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala/Schweden)

Elutionssäulen 18 x 1 cm und 60 x 1,5 cm, beide mit
G-2 Fritten
(Fa. Neumann, München)

Vakuum-Flaschen, 300 ml
(Fa. Empfenzeder, München)
Reaktionsgefäße 38/14
(Fa. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf)
Kaliumjodid, Merck 6580
sonst wie unter 3.3 angegeben.

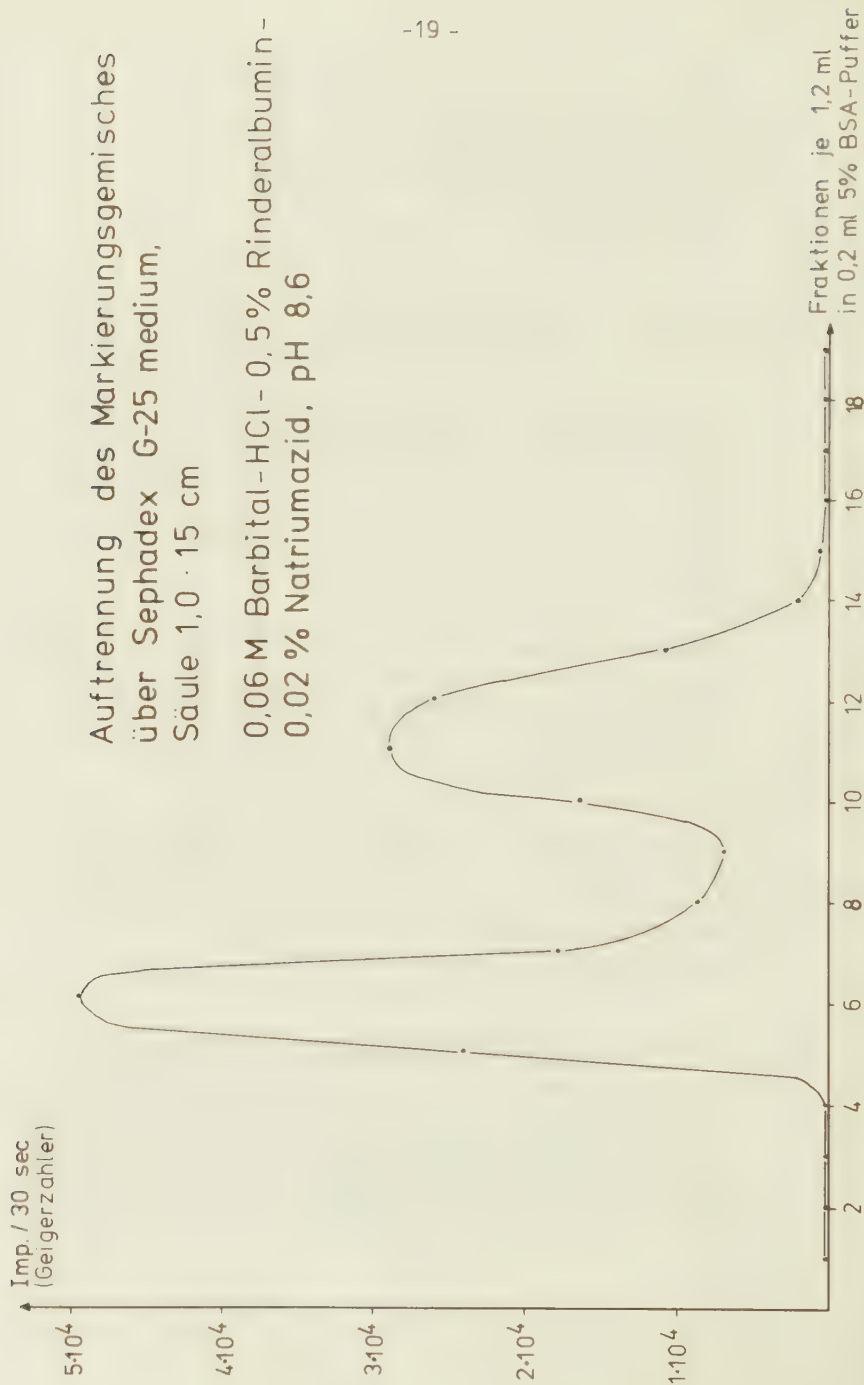
Das Markierungsgemisch wird über eine Säule mit Sephadex G-25 medium aufgetrennt. Sephadex wird über Nacht in aqua dest. in einer Vakuumflasche suspendiert und vor dem Gießen der Säule mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Säule für die erste Auftrennung hat 15 cm Gelhöhe und 1 cm Durchmesser, die Durchflußrate beträgt 48 ml/Stunde. Vor der Verwendung wird die Säule mit etwa 25 ml Puffer I (0,06 M Barbitat-HCl-Puffer mit 0,5 % BSA und 0,02 % Natriumazid, pH 8,6) äquilibriert.

Nach dem Auftragen des Markierungsgemisches auf die Säule wird das Reaktionsgefäß mit 0,4 ml einer einprozentigen Lösung von Kalium-Jodid in 0,05 M Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,5 nachgespült und dieser Puffer ebenfalls auf die Säule aufgetragen.

Das Eluat wird in 1,2 ml-Fraktionen in Eppendorfgefäßen gesammelt, in denen 0,2 ml Puffer III vorgelegt sind, um das markierte Peptid vor einer Adsorption an die Gefäße zu schützen. Die Aktivität der Fraktionen wird mit dem Geigerzähler gemessen (Abb. 5).

4.3 Rechromatographie der Gipfelfraktion des Peptidpeaks

Die Gipfelfraktion des Peptidpeaks der ersten Auftrennung wird am Tag der Markierung über eine Säule (Säulenmaße 1,5 x 60 cm, Durchflußrate 15 ml/Stunde) mit Sephadex G-50 superfine rechromatographiert (26). Die Säule wird vorbereitet wie unter 4.2 beschrieben. Das Eluat wird



in 1,5 ml-Fraktionen gesammelt. Zur Messung der Aktivität pipettieren wir aus den Fraktionen je 10 µl in Polystyrolröhrchen und zählen 60 Sekunden im Gammazähler. Abb. 6 zeigt ein typisches Beispiel der Aktivitätsverteilung einer solchen Rechromatographie.

Der kleinere Vorpeak, der bei allen Markierungen weniger als 10 % der Aktivität des Hauptpeaks enthielt, dürfte nach der Molekülgröße zu schließen durch eine Aggregatbildung des markierten Peptides verursacht sein.

Der Hauptpeak entspricht im wesentlichen dem intakten markierten Peptid B, der kleine Peak bei Fraktion 60 bis 65 ist freies Jod¹²⁵.

4.4 Austestung der Immunoreaktivität der Fraktionen

Dabei wird versucht, Proben des markierten Peptides mit soviel Antikörper im Überschuß reagieren zu lassen, daß theoretisch alles markierte Peptid, das immunologisch intakt ist, an den Antikörper gebunden werden kann (13).

Zu diesem Zweck werden von den Fraktionen des Vorpeaks und des Hauptpeaks der Rechromatographie (Abb. 6) wie folgt Dreifachproben angesetzt:

10 µl Eluat

100 µl Puffer I

500 µl Antiserum in Gebrauchsverdünnung.

Die Proben werden verschlossen, geschüttelt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wird die Aktivität der Proben im Gammazähler 30 Sekunden gezählt. Dann werden 0,6 ml Kohle-Dextran-Gemisch zugegeben, die Proben im Ständer kurz geschüttelt und 10 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die an die Kohle gebundene freie Aktivität im Gammazähler bestimmt. Zu jedem Ansatz gehören drei Proben ohne Antiserum, um die unspezifische Bindung zu bestimmen.

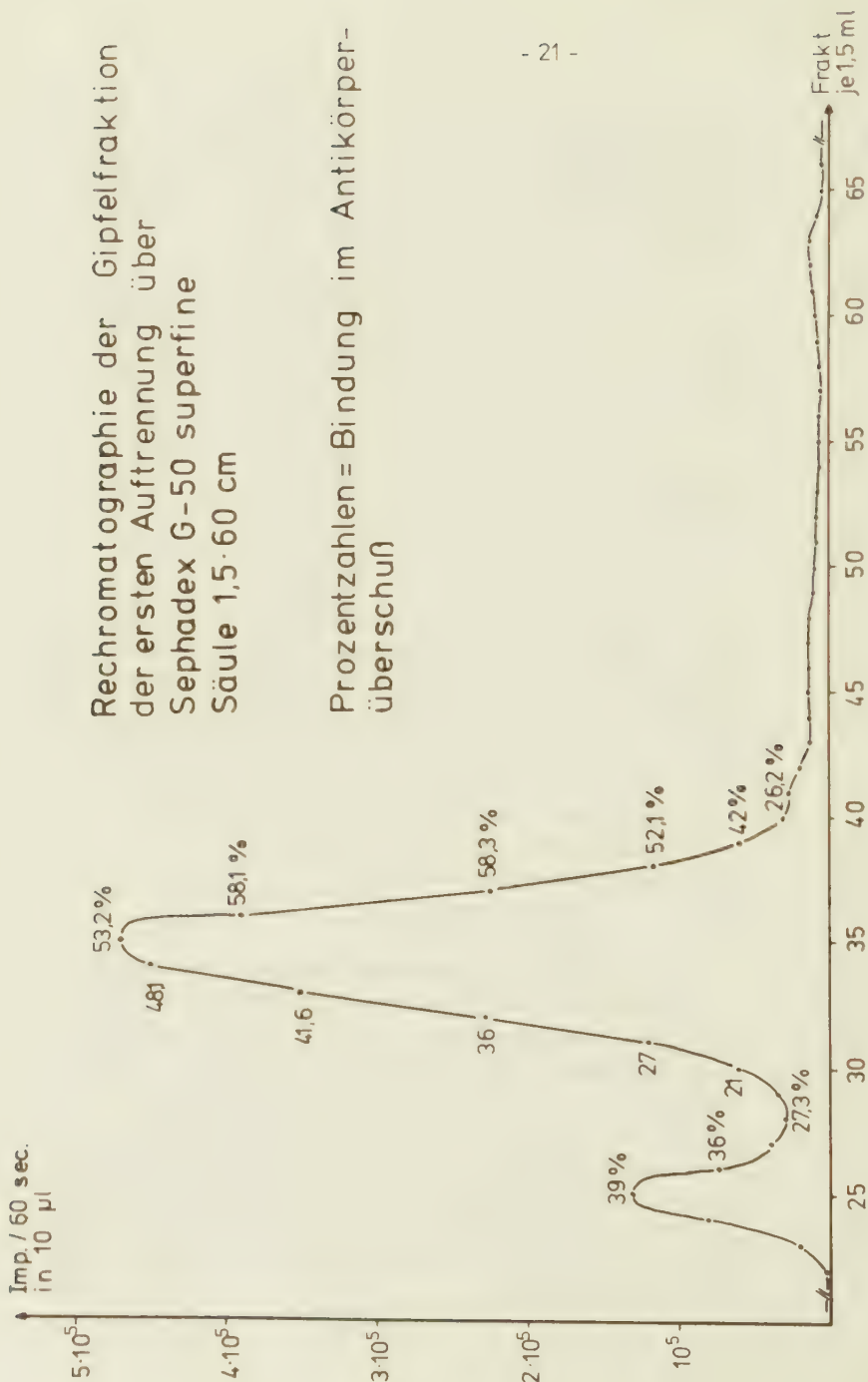


Abb. 6

Die Fraktionen, die bei diesem Vorversuch die höchste Bindung an den Antikörper zeigen, werden mit Puffer I auf die errechnete Gebrauchskonzentration (Abschnitt 10.2.2) verdünnt und bei -20°C eingefroren. Die höchste Immunoreaktivität findet sich meistens, aber nicht regelmäßig, am absteigenden Schenkel des Hauptpeaks (Abb.6).

Mit diesem Vorversuch können jeweils die Fraktionen, die mit dem Antiserum nicht optimal reagieren, von der weiteren Verwendung ausgeschlossen werden, was nicht möglich ist, wenn wir die Gipfelfraktion der ersten Auftrennung ungeprüft verdünnen. Im jetzigen Stadium, in dem der Assay durch das Antiserum in seiner Empfindlichkeit limitiert ist, scheint der Arbeitsaufwand für dieses Vorgehen gerechtfertigt.

Abb. 7 und 8 zeigen Standardkurven mit markiertem Peptid B aus einigen Fraktionen der in Abb. 6 dargestellten Rechromatographie. Einzelheiten zur Aufstellung von Standardkurven siehe Abschnitt 6.

Die dargestellten Kurven zeigen, daß mit der Steigerung der Immunoreaktivität im Antikörperüberschuß auch die Empfindlichkeit der Standardkurven verbessert wird.

4.5 Berechnung der spezifischen Aktivität

Bei der Berechnung der spezifischen Aktivität der Markierung kann die Restaktivität in der Sephadexsäule nicht berücksichtigt werden, da für uns eine genaue Messung technisch nicht möglich ist. Die gesamte Restaktivität im Reaktionsgefäß und an den Pipettenspitzen wird in die Berechnung als Verlust von markiertem Peptid eingesetzt.

Die Tracermenge je Probe wurde bei den meisten Markierungen auf 100-200 pg je Probe festgelegt (Abschnitt 10.2.2). Dies geschah u.a. auch unter dem Gesichtspunkt, daß bei den meisten Proben nach der Trennung eine Zähl-

Standardkurven mit
Fraktionen der Abb. 6

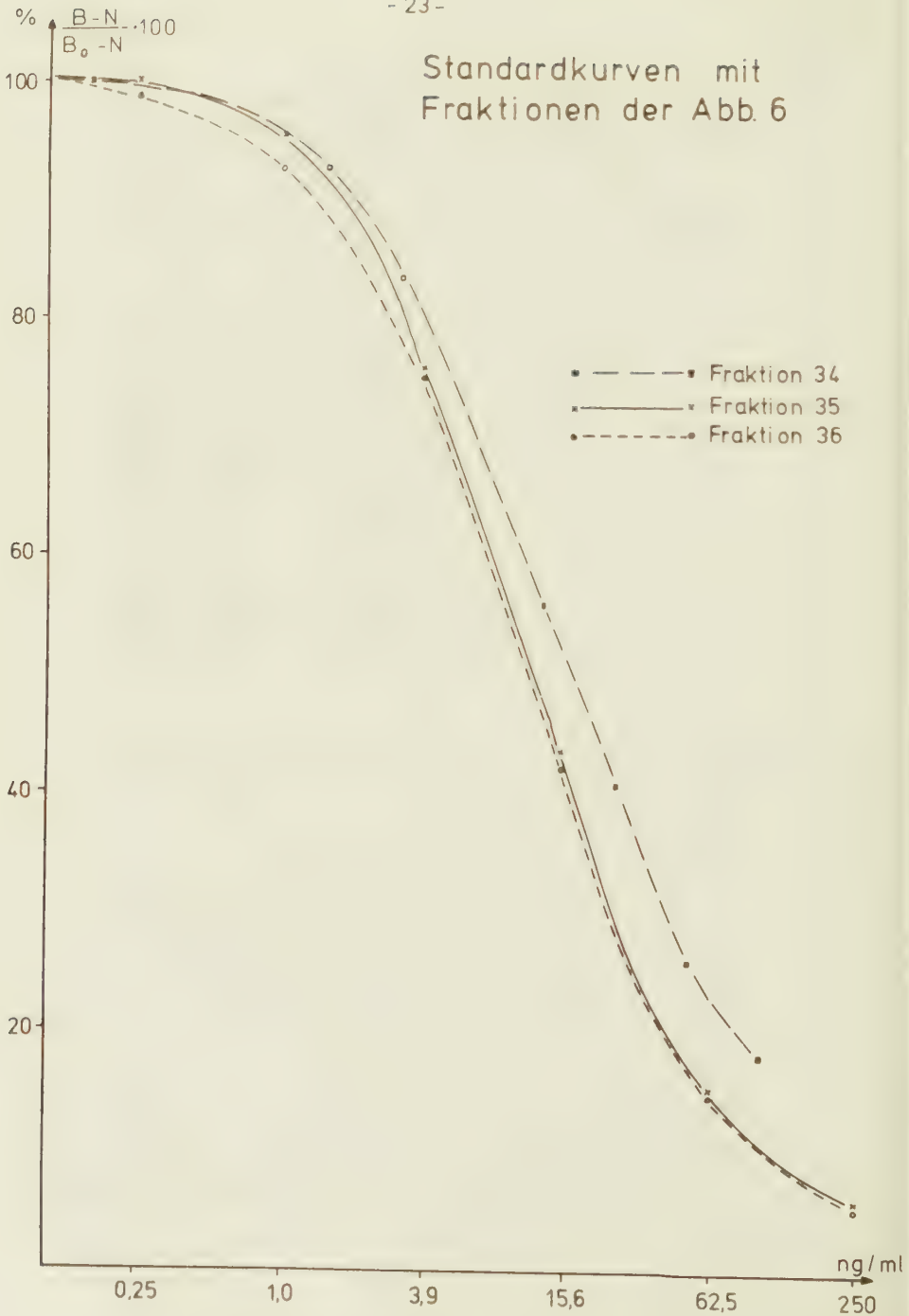


Abb. 7



Abb. 8

ausbeute von 10.000 Impulsen/100 Sekunden erreicht werden soll. Von jeder Markierung wird folgendes Protokoll angefertigt:

Datum Markiertes Peptid
 verwendete Aktivität mCi Jod¹²⁵
 Imp./30 sec am Geigerzähler vor d. Verwendung
 Restaktivität/30 sec
 Restaktivität = % =mCi

Fractionen der 1. Auftrennung:

Impulssumme im Peptidpeak Imp./30 sec
 = % = mCi
 Impulssumme im Jodpeak Imp./30 sec
 = %

Menge des eingesetzten Peptids µg
 Peptidmenge im Peptidpeak µg
 Aktivität im Peptidpeak mCi
 Spezifische Aktivität mCi/ µg

(Zählausbeute im Gammazähler: 1 nCi = 2690 Impulse in 100 Sekunden).

Für die Einzelprobe wird eine Tracermenge von pg B¹²⁵/Probe gewählt, die Tracerverdünnung wird hergestellt mit Impulsen/100 µl * 100 sec.

5

Elektrophoresen des markierten Peptids

Zur Kontrolle der Säulenchromatographie des markierten Peptids B und zum Versuch, im markierten Peptid den beschädigten Anteil in Unterfraktionen nachzuweisen, führen wir die Papierelektrophorese (1, 2, 26, 31) durch. Für andere Peptidhormone werden als Idealbedingungen angegeben, daß das immunologisch intakte Peptid an der Auftragungsstelle liegenbleibt, während beschädigtes Peptid und freies Jod¹²⁵ in Richtung der Anode wandern. Für Peptid B waren die häufig verwendeten

Papiere Whatman No. 1 und Whatman 3 MM nicht geeignet, da auf ihnen auch intaktes Peptid B wandert und breit aufgetrennt wird. Dagegen eignet sich das Ionenaustauschpapier Whatman DE 81 (13).

Immunologisch intaktes markiertes Peptid bleibt an der Auftragsstelle liegen abgesehen von einer Verbreiterung durch Diffusion. Die Grenze dafür wird in der Literatur in einer Entfernung von 1 cm von der Auftragsstelle angegeben. Wir haben die Aktivität der ersten 3 gemessenen Streifen, das entspricht 9 mm nach der Auftragsstelle, als intaktes Peptid gewertet. Beschädigtes Peptid wandert, an Serumproteine gebunden (2, 31), etwas aus diesem Peak heraus, freies Jod¹²⁵ hat eine Wanderungsgeschwindigkeit von etwa 12 cm pro Stunde. Für die Auftrennung ist es notwendig, daß der Puffer aus den Papierstreifen verdampfen kann, die Kammer wird deshalb während des Laufes nicht abgedeckt. Um das markierte Peptid vor unspezifischer Adsorption an das Elektrophoresepapier zu schützen, wird vor dem Lauf 5%iges Albumin aufgetragen und albuminhaltiger Puffer verwendet.

5.1 Methode der Papierelektrophorese.

Geräte und Reagenzien:

Netzgerät Hawksley
(Fa. Lancing, Sussex/England)

Elektrophoresekammer Modell Kohn U 77
(Fa. Shandon Labortechnik, Frankfurt/Main)

Elektrophoresepapiere : Whatman 1, Whatman 3 MM,
Whatman DE 81 Zellulosepapier
(Fa. Hormuth-Vetter, Wiesloch)

Barbital-HCl-Puffer, 0,06 M, pH 8,6 mit 0,2 %
Rinder-Serum-Albumin = Puffer IV

Humanalbumin Biotest 5 %
(Fa. Biotest, Frankfurt/Main)

Der Puffer IV für die Elektrophoresen wird vorgekühlt. 3 cm breite, 32 cm lange Whatman DE 81 Streifen werden in Puffer getränkt, zwischen Filterpapier getrocknet und auf ein Tablett gelegt. Auf die Auftragsstelle 2 cm vor der Kathode werden 50 μ l fünfprozentiges Humanalbumin aufgetragen und im Kühlschrank 5 Minuten getrocknet. Die Streifen werden in die mit Puffer gefüllte Kammer eingespannt. Je nach Aktivitätsgehalt der Proben werden 10 bis 100 μ l mit Eppendorfpipetten aufgetragen. Das Netzgerät wird auf 480 Volt Spannung und je Streifen auf 3 mA Stromstärke geschaltet. Die Kammer steht während des Laufes offen im Kühlschrank.

Nach dem Lauf werden die Streifen 10 bis 15 Minuten bei 110° C im Trockenschrank getrocknet, in 3 mm breite Streifen geschnitten und in Polystyrolröhrchen im Gammazähler gemessen.

In der graphischen Darstellung der Ergebnisse ist der prozentuale Anteil jedes Schnittes an der im ganzen Streifen enthaltenen Aktivität gegen die Papierlänge aufgetragen. Wenn bei langer Laufzeit das freie Jod aus dem Streifen herauswandert, entspricht hier GA nicht mehr der aufgetragenen Aktivität.

5.2 Kontrollelektrophorese des Markierungsgemisches

Dabei soll der Anteil des freien radioaktiven Jods auf dem Streifen noch meßbar sein. Für diesen Zweck genügen 35 Minuten Laufzeit. Abb. 9. zeigt die gute Übereinstimmung mit der Sephadex-Trennung dieses Markierungsgemisches. Das freie Jod ist in der Elektrophorese weit zur Anode gewandert.

5.3 Versuch der Darstellung des beschädigten Peptids.

Bei der Laufzeit von 35 Minuten erschien uns eine sichere Aussage über den Anteil an beschädigtem Peptid nicht

Auftrennung des Markierungsgemisches über Sephadex G-25

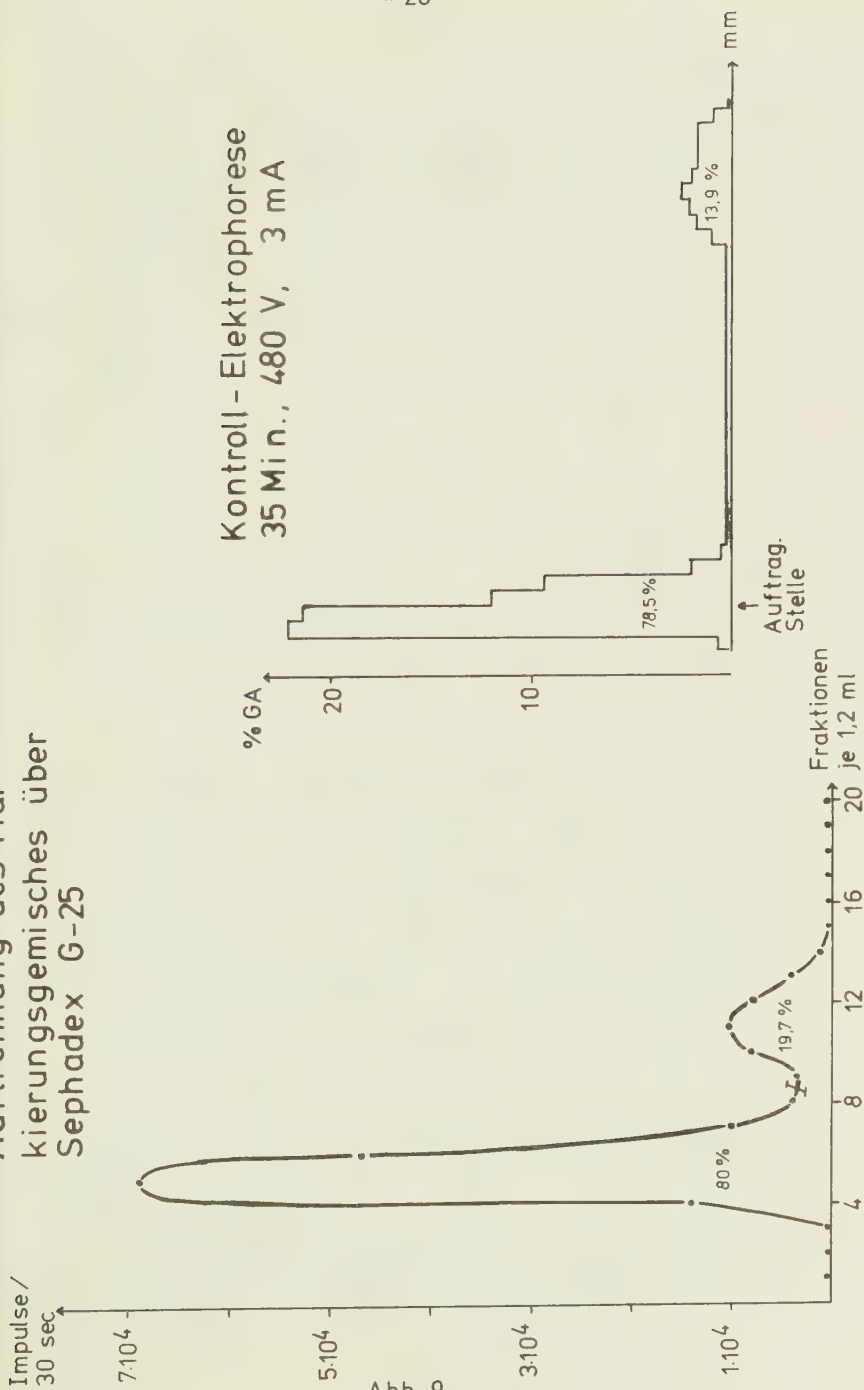


Abb. 9

möglich. Deshalb wurden unter sonst gleichen Bedingungen Markierungsgemische und Fraktionen der Säulenchromatographie 180 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Viele Vergleiche haben ergeben, daß auch damit präzise Aussagen über den Anteil an intaktem Peptid nicht möglich sind. Bei guten Markierungen ist der Anteil der Aktivität, die an der Auftragsstelle liegenbleibt, regelmäßig über 90 % (oberer Teil der Abb. 10). Der Vorversuch im Antikörperüberschuß ist durch die Papierelektrophorese nicht zu ersetzen.

Wird der Anteil an beschädigtem Peptid höher, etwa bei den Versuchen zur Lagerung des Tracers, so wird der Informationswert der Papierelektrophorese größer. Als Beispiel ist die zweite graphische Darstellung der Abb. 10 angegeben, bei der ein Anteil von 17,4 % (schraffiert dargestellt) nicht mehr in der Grenze von 9 mm nach der Auftragsstelle liegt und als beschädigtes Peptid gewertet wird.

5.4 Analytische Acrylamidgelelektrophorese

Ein weiterer Versuch zur Qualitätskontrolle des markierten Peptids und zum Nachweis eventueller Unterfraktionen wurde mit der analytischen Polyacrylamidgelelektrophorese unternommen (1, 2). Sie wurde in 15 %iger Acrylamidkonzentration im Trenngel bei pH 8,3 durchgeführt unter den gleichen Bedingungen, die zur Reinheitskontrolle bei der Präparation von Peptid B benützt werden (30). Die Ergebnisse waren nicht aussagekräftiger als bei der Papierelektrophorese.

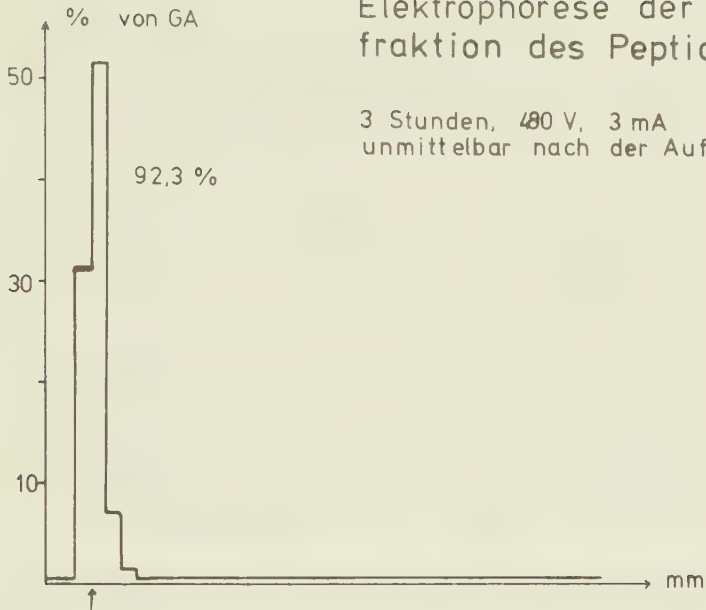
6. Aufstellung von Standardkurven

6.1 Standardkurven in Puffer

Die Aufstellung der Standardkurve beruht auf folgendem Prinzip (3, 9, 23, 55): Das System besteht aus dem ersten Antikörper in einer Verdünnung, die im Vorversuch

Elektrophorese der Gipfel- fraktion des Peptidpeaks

3 Stunden, 480 V, 3 mA
unmittelbar nach der Auftrennung



3 Stunden, 480 V, 3 mA
nach 3 Wochen Aufbewahrung
bei - 20 ° C

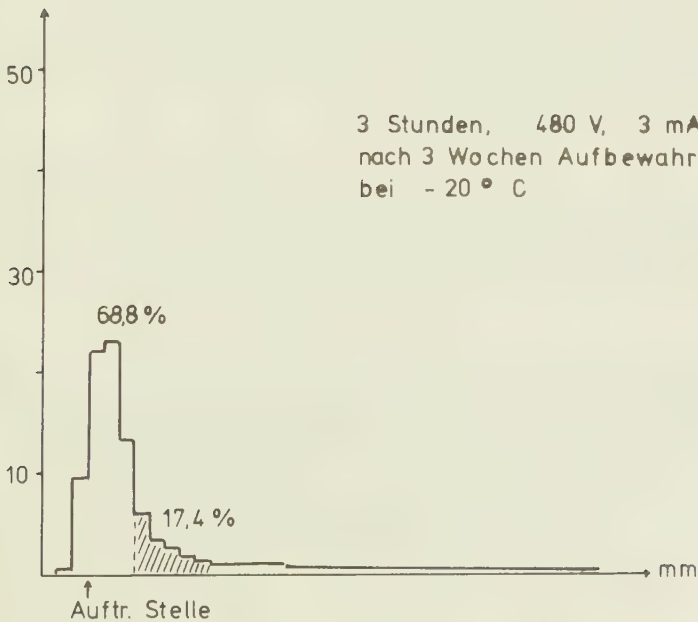


Abb. 10

ca. 50 % des zugegebenen markierten Antigens gebunden hat (Abb. 2), das Bindungsvermögen des Antikörpers muß limitiert sein. Neben einer gleichbleibenden Menge markiertem Antigen werden zu den Proben je 100 µl einer Verdünnungsreihe von Peptid B in Puffer III gegeben. Das unmarkierte Antigen konkurriert mit dem markierten um die Bindungsstellen des Antikörpers und verdrängt mit zunehmender Konzentration das markierte Peptid völlig aus der Bindung an den Antikörper.

Für die Standardkurven wird Peptid B aus Präparationen verwendet, die in der analytischen Acrylamidgelelektrophorese und in der Analyse der N-terminalen Aminosäure einheitlich waren. Einige Präparationen wurden gepoolt und lyophilisiert aufbewahrt, so daß wir für längere Zeit über eine gleichmäßige Standardsubstanz verfügen.

Von diesem Pool werden bei Bedarf 100 µg abgewogen und eine Verdünnungsreihe in 5 %igem BSA-Puffer hergestellt, die 11 Konzentrationen von 100 ng bis 0,097 ng Peptid B/ml enthalten. Die Verdünnungen werden in 0,5 ml-Portionen in Eppendorffgefäßen bei -20°C eingefroren, zu jeder Reihe wird ein Gefäß mit 1,2 ml Lösungsmittel eingefroren für die B_0 -Werte und N-Werte.

In dieser Arbeit sind Standardkurven mit unterschiedlichen Antigenkonzentrationen angegeben, da die eingesetzten Verdünnungsreihen im Lauf der Zeit mehrmals geändert wurden. Die Aussage der Standardkurven verändert sich dadurch nicht.

Zu jeder Standardkurve gehören 6 Proben ohne unmarkiertem Antigen zur Ermittlung des B_0 -Wertes (maximale Bindung von markiertem Antigen im jeweiligen Ansatz) und 3 Proben, in denen das erste Antiserum durch Kaninchen-Normalserum in der verwendeten Verdünnung des Antiserums ersetzt wird und kein unmarkiertes Antigen zugesetzt wird zur Bestimmung

der unspezifischen Bindung N, die in manchen graphischen Darstellungen als Waschwert (W) bezeichnet ist. In die Proben der B_0 -Werte und der N-Werte wird die gleiche Menge Lösungsmittel zugegeben wie zu den Proben.

Von den zahlreichen Möglichkeiten, die Ergebnisse einer Standardkurve rechnerisch und graphisch darzustellen, haben wir die Berechnung der antikörpergebundenen Impulse bezogen auf die Impulse der B_0 -Werte als 100% gewählt. Die graphische Darstellung geschieht mit der S-förmigen Kurve, die zugesetzte unmarkierte Antigenmenge wird in logarithmischem Maßstab auf der Abszisse angegeben. Weitere Hinweise für Berechnungen enthält Abschnitt 9. Diese Erläuterungen gelten für alle Standardkurven unabhängig von den Trennmethoden, die in Absatz 8 beschrieben werden.

6.2 Wiederfindekurven in Schweineserum

Die Auswahl von 5 %igem BSA-Puffer als Lösungsmittel für die Standardkurven geschah nach zwei Gesichtspunkten: Die Standardkurven in diesem Puffer verliefen steiler als in anderen getesteten Lösungsmitteln und sie zeigten die beste Annäherung an Wiederfindekurven in Schweineserum, die wir für weitere biologische Untersuchungen anstreben (29) (Abb. 11).

Es ist bisher nicht gelungen, die Diskrepanz zwischen Standardkurven in Puffer und Wiederfindekurven in "Peptid B freiem" Schweineserum ganz auszugleichen (25). Als "Peptid B freies" Schweineserum bezeichnen wir Serum, bei dem in mehrmaligen Kontrollen im Nativserum kein Peptid B gemessen werden konnte. Teilweise wurde das Serum mit Aktivkohle (51) (1 g auf 10 ml Serum) über eine Stunde mehrmals geschüttelt und dann zentrifugiert. Aus dieser Weise wurde versucht, evtl. freies Peptid im Serum mit der Aktivkohle zu entfernen. Bei den Schwierigkeiten mit den Wiederfindekurven sind offensichtlich Serumfaktoren wirksam, die auch die Bindungsfähigkeit des Antikörpers beeinflussen. Es ist auch von Bedeutung,



Abb. 11

ob das Schweineserum mit zugesetztem Antigen als Probe für die Wiederfindekurve eingefroren oder ob das gleiche Serum zu den Standardkurven in Puffer zugesetzt wird. Alle Versuche, diese störenden Faktoren durch Variationen der Albuminkonzentration des Puffers, Zusatz von EDTA zum Puffer und Zusatz verschiedener Tierseren zu den Standardproben zu beseitigen, blieben bisher unbefriedigend (39, 57). Diese Schwierigkeiten vor allem haben uns bisher daran gehindert, in größerem Umfang die Bestimmung von Peptid B im Serum durchzuführen.

Inkubationsmethoden

7.1 Versuchsdurchführung

Zur Ermittlung optimaler Inkubationsbedingungen wurden folgende Versuche angesetzt (2, 48):

Die Versuche Nummer 1 bis 8 wurden bei Zimmertemperatur pipettiert und inkubiert (22° C).

1. gleichzeitige Inkubation von Standard, Antiserum und Tracer 3 Tage lang, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
2. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 24 Stunden, dann mit Tracer 24 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
3. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 24 Stunden, dann mit Tracer 48 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
4. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 72 Stunden, dann mit Tracer 48 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
5. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 96 Stunden, dann mit Tracer 48 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,

6. Präpräzipitation von 1. und 2. Antikörper für 24 Stunden, dann wurden Standard und Tracer zugegeben, 48 Stunden später wurde zentrifugiert,
7. Präpräzipitation von 1. und 2. Antikörper für 48 Stunden, nach Zugabe des Standards 24 Stunden inkubiert, mit dem Tracer weitere 72 Stunden, dann zentrifugiert,
8. heiße Vorinkubation von Tracer und Antiserum für 48 Stunden, nach Zugabe des Standards weitere 48 Stunden inkubiert, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper.

Die Versuche Nummer 9 bis 16 wurden auf Eis pipettiert und im Kühlschrank inkubiert:

9. gleichzeitige Inkubation von Standard, Antiserum und Tracer 3 Tage lang, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
10. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 24 Stunden, dann mit Tracer 24 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
11. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 24 Stunden, dann mit Tracer 48 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
12. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 72 Stunden, dann mit Tracer 48 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
13. kalte Vorinkubation von Standard und Antiserum für 96 Stunden, dann mit Tracer 48 Stunden, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper,
14. Präpräzipitation von 1. und 2. Antikörper für 24 Stunden, dann wurden Standard und Tracer zugegeben, 48 Stunden später wurde zentrifugiert,

15. Präpräzipitation von 1. und 2. Antikörper für 48 Stunden, nach Zugabe des Standard 24 Stunden inkubiert, mit dem Tracer weitere 72 Stunden, dann zentrifugiert,
16. heiße Vorinkubation von Tracer und Antiserum für 48 Stunden, nach Zugabe des Standard weitere 48 Stunden inkubiert, anschließend 16 Stunden mit dem 2. Antikörper.

Die Versuchsnummern sind auf den folgenden graphischen Darstellungen zur Identifikation der Kurven angegeben.

Diese Versuche wurden mit der Doppelantikörpermethode getrennt, es muß deshalb hier ein Versuch vorweggenommen werden, der die Begründung für die 16-stündige Inkubation mit dem 2. Antikörper gibt. Proben, die mit dem 1. Antikörper 3 Tage unter identischen Bedingungen inkubiert waren, wurden nach Zugabe des 2. Antiserums parallel bei 4°C , 20°C und 37°C inkubiert. Die Zeit wurde von 10 Minuten bis 48 Stunden variiert. Aus diesem Versuch wissen wir, daß die Reaktion nach 16 Stunden in ein Gleichgewicht kommt, die Ergebnisse bei 4°C und bei Zimmertemperatur sind fast identisch, sie liegen höher als bei 37°C .

Die Versuche zur Inkubationsmethode haben ergeben, daß Sensibilität und gute Übereinstimmung der Dreifachproben nur zu erzielen sind, wenn sich die Antigen-Antikörperreaktion im Gleichgewicht befindet (22, 39).

7.2 Ergebnisse

In den Abb. 12 bis 14 ist ein Teil der Standardkurven wiedergegeben, die aus diesen Versuchen stammen.

Bei gleichzeitiger Inkubation von Standard, Antiserum und Tracer über 3 Tage muß bei Zimmertemperatur inkubiert werden. Die Variationskoeffizienten der Drei-

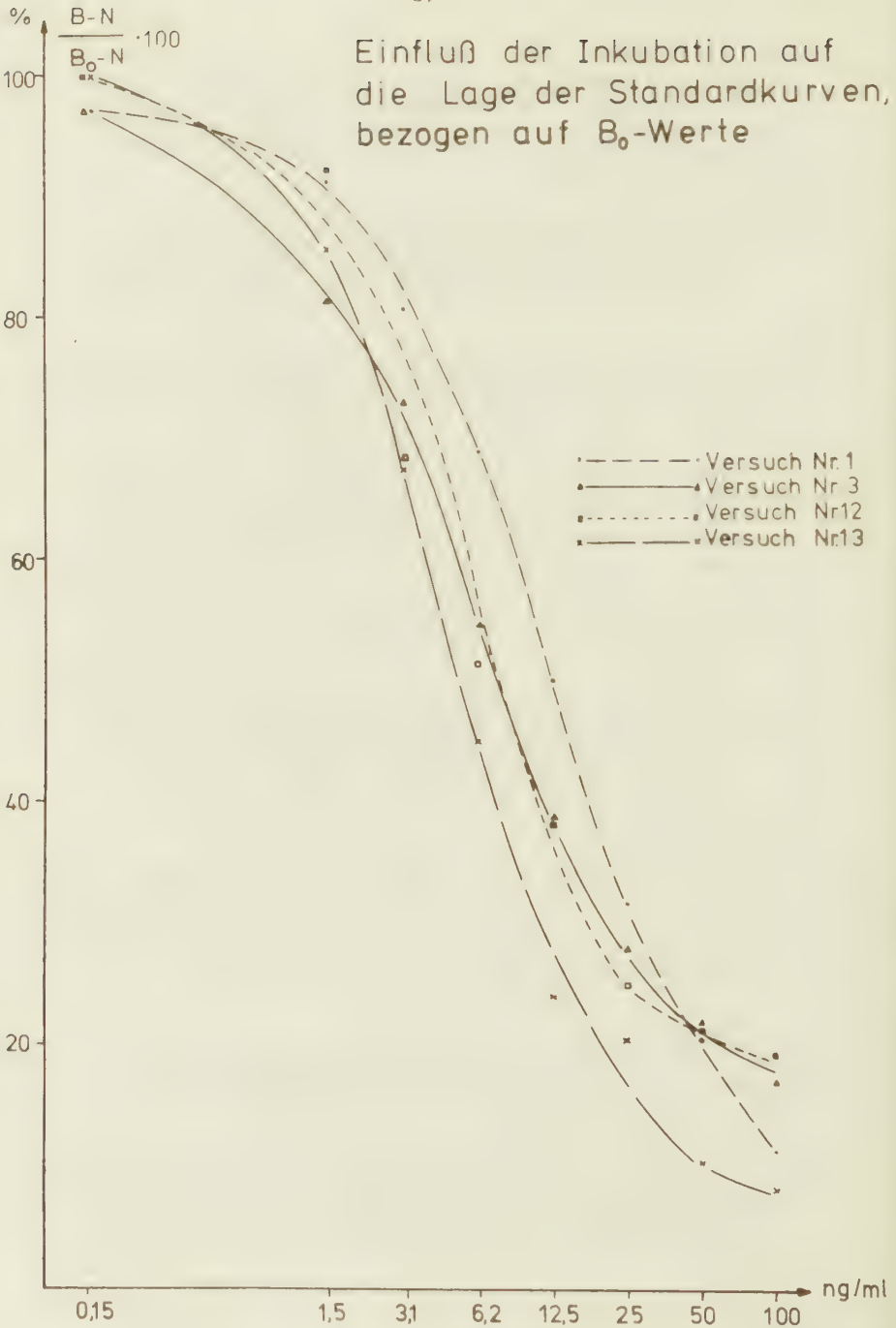


Abb. 12

fachproben im Meßbereich liegen zwischen 0,5 und 4 %. Die einzelnen Meßpunkte ergeben eine ausgewogene Kurve (Versuch Nr. 1 in Abb. 12 und 13). Bei 4° C können alle diesen positiven Ergebnisse nicht erreicht werden, die Reaktion scheint bei dieser Temperatur noch nicht im Gleichgewicht zu sein.

Wenn man bei der kalten Vorinkubation (16, 21) zuerst Standard oder unbekannte Proben ohne markiertem Hormon mit dem Antiserum inkubiert, hat die Bindung des unmarkierten Antigens an das Antiserum Priorität. Das markierte Antigen, das später zugegeben wird, bindet sich an die Stellen des Antikörpers, die freigeblieben sind. Die Methode ist möglich, weil die Antigen-Antikörperreaktion nur langsam eintritt und teilweise reversibel ist. Bei dieser Technik wird die Sensivität erhöht, indem die Bindung des unmarkierten (unbekannten) Antigens an das Antiserum favorisiert wird.

Alle Versuche mit kalter Vorinkubation haben bei uns wesentlich niedrigere B_0 -Werte als sie bei gleichzeitiger Inkubation erreicht werden können. Zur besseren Darstellung wurden die Kurven in Abb. 13 und 14 auf GA bezogen. Die Standardkurven mit kalter Vorinkubation sind aber - wenn man die B-Werte auf B_0 bezieht - zum Teil wesentlich empfindlicher als die Kurven bei gleichzeitiger Inkubation (Versuch Nr. 12 und 13 in Abb. 12 und 13).

Bei Versuch Nr. 2 (Abb. 13) scheint das Gleichgewicht bei 48 Stunden Inkubation vor Zugabe des 2. Antikörpers noch nicht erreicht zu sein, Versuch Nr. 3 (Abb. 12 und 13) hat bei Zimmertemperatur die optimale Inkubationszeit. Bei den Versuchen 4 (Abb. 13) und 5 (nicht gezeichnet) hat möglicherweise die Bindungsfähigkeit infolge zu langer Inkubation schon wieder nachgelassen. Bei 4° C

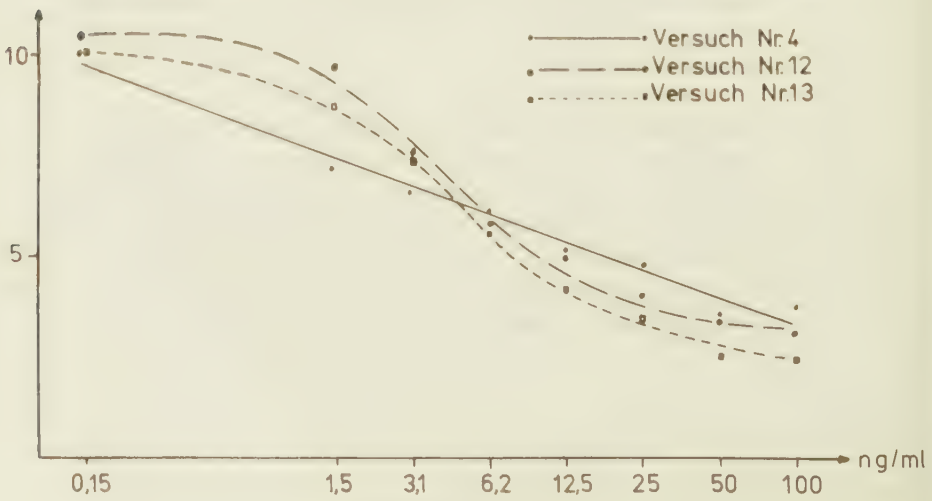
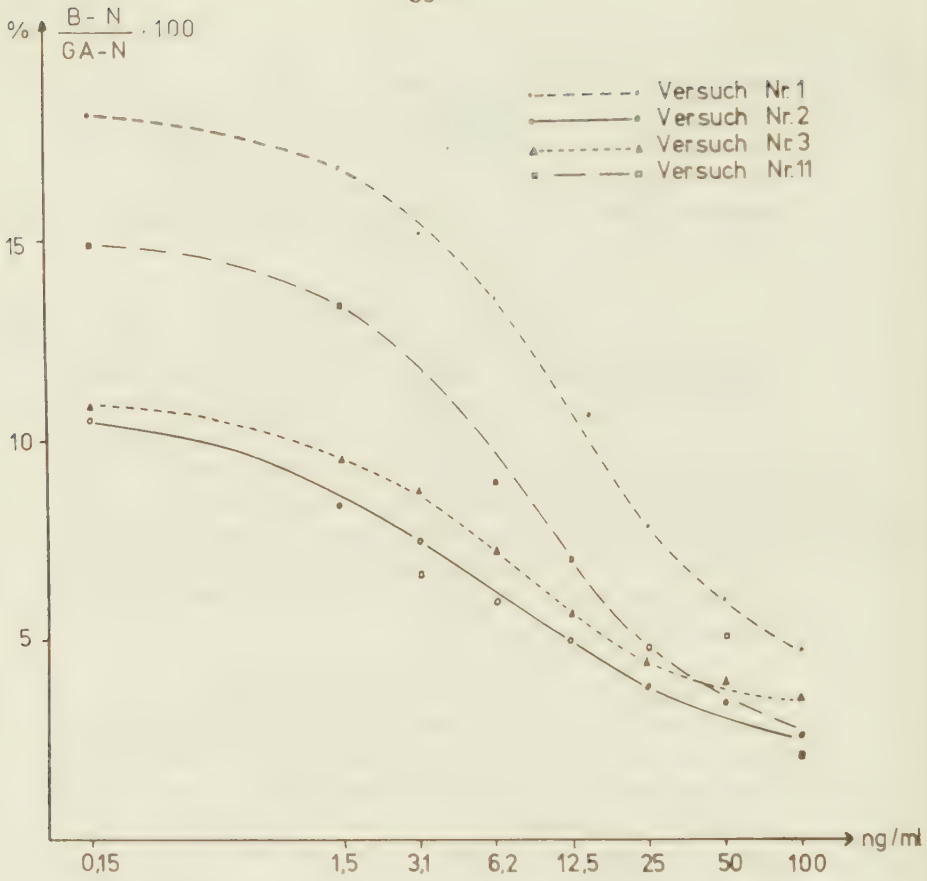


Abb. 13

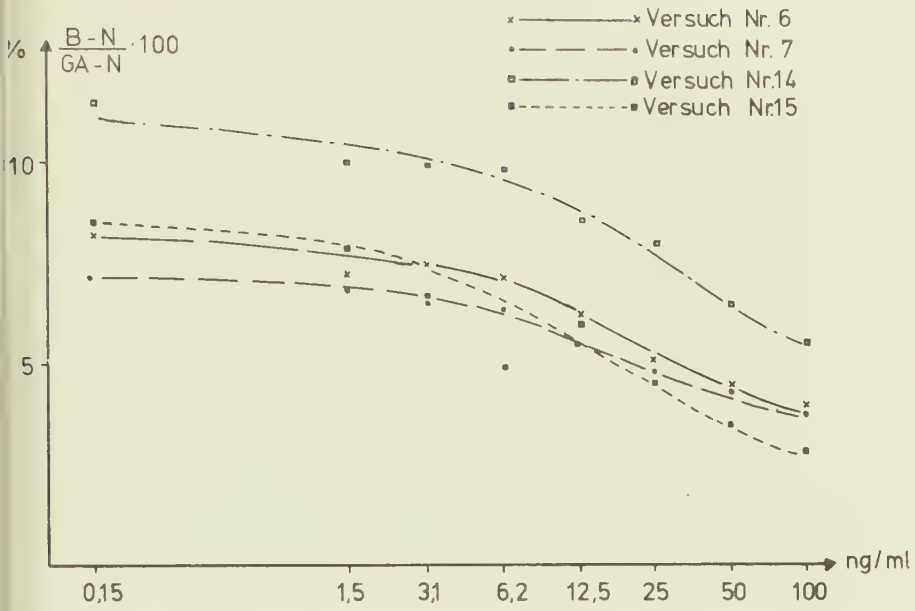


Abb. 14

braucht die Reaktion länger, die Verbesserung der Ergebnisse zwischen Versuch 12 und 13 (Abb. 12 und 13) ist deutlich.

Abb. 14 zeigt die sehr flachen Kurven, die mit der Prä-
präzipitation bei den gewählten Inkubationszeiten entstehen. Die Versuche Nr. 8 und 16 mit heißer Vorinkubation ergeben keine verwertbaren Kurven.

Für alle weiteren Ansätze wurde die Inkubationsmethode des Versuchs Nr. 13 - 96 Stunden kalte Vorinkubation, mit Standard 48 Stunden, gesamte Inkubation im Kühlschrank - gewählt. Diese Zeiten gelten auch für andere Trennmethode, die unter 8.3 und 8.4 angegeben werden. Die Trennung erfolgt dann zu dem Zeitpunkt, zu dem bei der Doppelantikörpermethode der 2. Antikörper zugegeben wird.

8.

Trennung von freiem und antikörpergebundenem Antigen

Geräte und Reagenzien:

Kühlzentrifuge Universal Rapid mit Stahlrotor, 32 x 4 ml
(Fa. Christ, Osterode)

Rotationsmischer 3300
(Fa. Eppendorf, Hamburg)

Mikro-Pumps MP 13/25, 13 Kanal
(Fa. Ismatec, Zürich/Schweiz)

Magnetrührer
(Fa. Cenco, Breda/Holland)

Anti-Rabbit-Precipitating Serum (donkey),
empfohlene eingesetzte Verdünnung 1 : 24
(Fa. Wellcome, Beckenham/England)

CA-Elektrophoresestreifen
(Fa. Schleicher und Schüll, Dassel)

Haemaccel 3,5 %
(Behringwerke, Marburg)

Polyäthylenglykol Type 6.000, Serva 33 137

Titriplex III = Natrium EDTA, Merck 8418

Semiautomatisches Gerät zur Filtertrennung, mit dem gleichzeitig 20 Proben getrennt werden können (6), hergestellt in der Werkstätte des Physiologischen Instituts der Universität München.

Sonst wie unter 3.3 angegeben.

Zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Antigen wurden von den in anderen Radioimmunoassays gebräuchlichen Methoden folgende auf die Anwendbarkeit für Peptid B untersucht:

1. Doppelantikörpermethode, Trennung über Filter
2. Doppelantikörpermethode, Trennung durch Abzentrifugieren des Präzipitats
3. Trennung mit dextranbeschichteter Kohle
4. Trennung mit Polyäthylenglykol.

8.1 Doppelantikörpermethode, Trennung über Filter:

Die Doppelantikörpermethode (32, 38) beruht auf der Immunopräzipitation des Hormon-Antikörper-Komplexes mit einem 2. Antikörper, der gegen das Serum oder gegen die Gammaglobulinfraktion der Tierspezies gerichtet ist, bei der der erste Antikörper erzeugt wurde. Der erste Komplex aus Hormon und spezifischem Antiserum ist löslich. Die zweite Reaktion des spezifischen Antiserums mit dem Anti-Gammaglobulin-Serum ist präzipitierend und ermöglicht die Abtrennung durch Filtrieren oder Zentrifugieren. Bei starker Verdünnung des 1. Antikörpers ist das Präzipitat nur abzutrennen, wenn die Gesamtmenge an Serum oder Gammaglobulinen der gewählten Tierspezies einen bestimmten Grenzwert übersteigt. Man nimmt an, daß bei der Bildung eines größeren Präzipitats die stark verdünnten Hormon-Antiserum-Komplexe besser von der Reaktion miterfaßt werden.

Die Verdünnung des 1. Antikörpers und die Inkubation wurden im Abschnitt 3.3 und 7 besprochen.

8.1.2 Zweiter Antikörper

Die Konzentration des 2. Antikörpers und des notwendigen Trägerserums wird für jede Verdünnung des 1. Antiserums und jede Charge des 2. Antikörpers in einem Versuch nach Angaben von ERHARDT bestimmt (15). Diese Methode ist für uns einfacher und zuverlässiger als die

quantitative photometrische Bestimmung des Gammaglobulin-Antigammaglobulin-Komplexes (16, 37).

Für diese Versuche haben wir mit Kaninchen-Normalserum, in dem bei Prüfung von 100 μ l Serum unverdünnt im Assay kein Peptid B gemessen werden konnte, mit Puffer I Verdünnungsreihen hergestellt, die je 0,1 ml Puffer (1 μ l bis 0,05 μ l) 12 verschiedene Konzentrationen Kaninchen-Normalserum enthalten. Die Verdünnungsreihen wurden in 2 ml Portionen in Polystyrolröhrchen eingefroren.

Der Versuch wird mit konstanten Konzentrationen des ersten Antikörpers und des Tracers durchgeführt, variiert werden die Normalserum-Konzentration und die Konzentration des 2. Antikörpers.

In der graphischen Darstellung (Abb. 15) beziehen sich die Konzentrationsangaben für den ersten und zweiten Antikörper und für das Normalserum auf 100 μ l.

Pipettiert werden: 100 μ l Verdünnung 1. Antikörper
100 μ l Normalserum-Verdünnung
100 μ l Tracer
200 μ l Puffer I.

Nach 3 Tagen Inkubation bei Zimmertemperatur werden 100 μ l Verdünnung des 2. Antikörpers pipettiert und vor der Trennung noch einmal 16 Stunden inkubiert.

Nach dem Ergebnis der Abb. 15 haben wir für den jetzt verwendeten ersten Antikörper (eingesetzte Verdünnung 1 : 1200) für den 2. Antikörper die Verdünnung 1 : 48 ausgewählt und verzichten auf die Zugabe von Kaninchen-Normalserum, da damit das gleiche gute Resultat zu erzielen ist wie mit 0,05 μ l Normalserum je Probe.

Der Gesamtanteil an Kaninchen-Serumeiweiß liegt mit 0,083 μ l je Probe - das entspricht 0,166 μ l je ml Inkubationsgemisch - niedriger als in anderen Veröffentlichungen angegeben (32, 37).

Vorversuch zum 2. Antikörper

1. Antikörper: XXII, 1:1200

2. Antikörper: Wellcome Serum, Charge 8780

Trennung über Filter

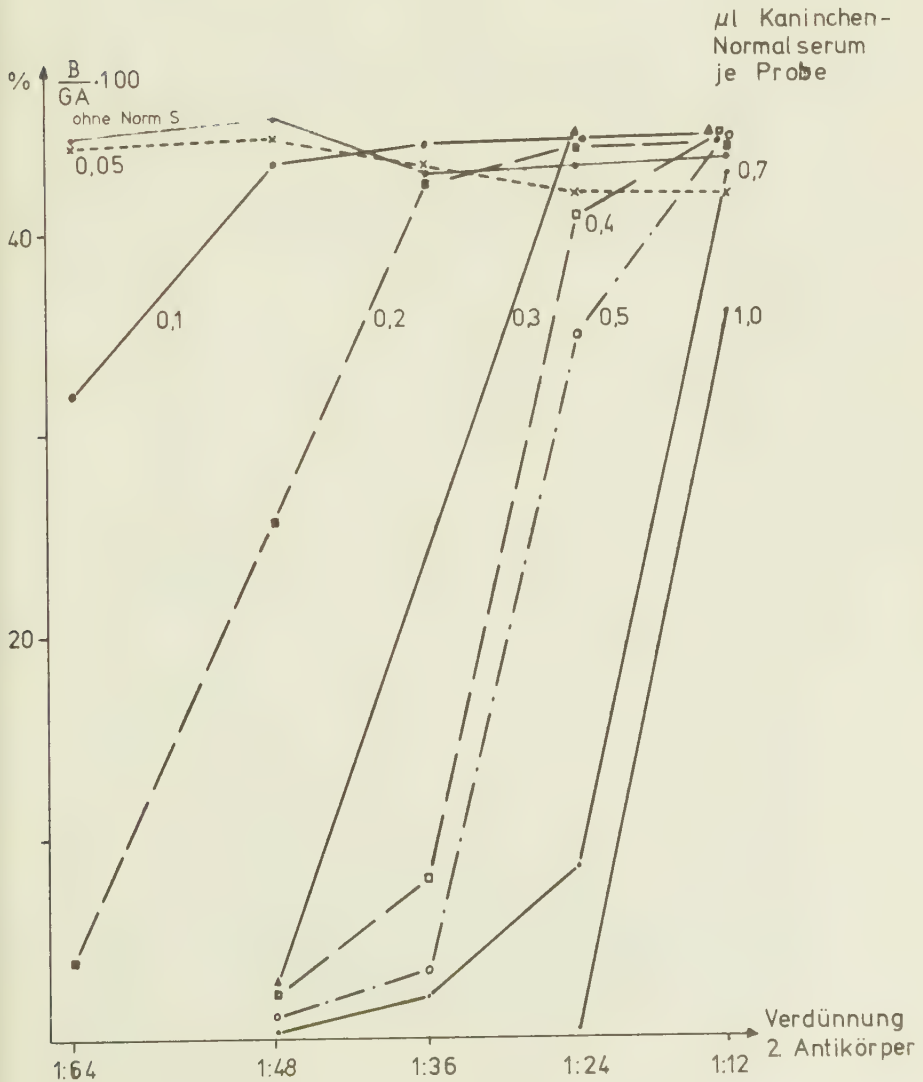


Abb. 15

Pipettierplan

Aufgrund dieser Vorversuche arbeiten wir zur Zeit nach folgendem Pipettierplan: Tabelle 3.

Tabelle 3

Pipettierplan Alle Angaben in ml.

Zahl der Proben	Puffer III mit Antigen	Serum mit Antigen	Puffer III	Serum	Puffer I	Verdünnung 1. Antik.	Verdünnung Normalserum	unbe- kannte Probe
6	Gesamtaktivität	-	-	-	-	-	-	-
6	O-Werte der Standardkurve	-	0,1	-	0,2	0,1	-	-
je 3	Werte der Standardkurve	0,1	-	-	0,2	0,1	-	-
3	N-Werte der Standardkurve	-	0,1	-	0,2	-	0,1	-
6	O-Werte der Wiederfindekurve	-	-	0,1	0,2	0,1	-	-
je 3	Werte der Wiederfindekurve	-	-	0,1	0,2	0,1	-	-
3	N-Werte der Wiederfindekurve	-	-	0,1	0,2	-	0,1	-
3	Probe 1	-	-	-	0,2	0,1	-	0,1
3	Probe 2	-	-	-	0,2	0,1	-	0,1

Zu allen Proben wird nach 4 Tagen 0,1 ml Verdünnung des markierten Peptid B zugegeben. Nach weiteren 2 Tagen wird zu allen Proben außer den ersten 6 (Bestimmung der Gesamtaktivität) 0,1 ml Verdünnung des 2. Antikörpers pipettiert und vor der Trennung 16 Stunden inkubiert.

Standard, Proben und Puffer werden mit den Eppendorf-Dosierer in Eppendorfgefäße pipettiert. In einem zweiten Pipettierschritt wird das Antiserum, bzw. das Normalserum, zugegeben. Die Gefäße werden verschlossen, geschüttelt und im Kühlschrank inkubiert. Nach 4 Tagen wird auf alle Proben der frisch aufgetaute Tracer ebenfalls mit dem Eppendorf-Dosierer pipettiert, außerdem wird in Polystyrolröhrchen, in denen später auch die Filter gezählt werden, 0,1 ml Tracer zur Bestimmung der Gesamtaktivität gegeben. Obwohl die Proben durch das Einpipettieren gut durchgemischt werden, haben wir uns angewöhnt, die Proben nach jedem Pipettierschritt auf dem Eppendorf-Rotationsmischer kurz zu schütteln, um auch Flüssigkeitsreste von den Gefäßwänden zu entfernen. Nach 6 Tagen wird der 2. Antikörper in 0,1 ml Puffer zugegeben.

Am nächsten Tag werden die Gefäße für die weitere Bearbeitung auf Eis gestellt, die Proben werden geschüttelt, die Deckel abgeschnitten.

3.1.3 Trennmethode

2 x 2 cm große Stücke der CA-Elektrophoresestreifen werden in Haemaccel^R (anstelle von serumhaltigem Puffer) eine Stunde eingeweicht. Sie werden auf die Fritten gelegt und die Absaugvorrichtung in jeweils 20 Proben eingetaucht. Die Probengefäße werden zweimal mit je 0,7 ml eisgekühltem Haemaccel^R nachgespült. Nachdem die ganze Flüssigkeit abgesaugt ist, werden die Filter mit Pinzetten von den Fritten abgenommen und in Polystyrolröhrchen verbracht zur Aktivitätsbestimmung im Gammazähler. Die unspezifische Bindung (N-Werte) liegt bei dieser Trennmethode regelmäßig unter 0,8 % der Gesamtaktivität.

8.2 Doppelantikörpermethode, Trennung durch Abzentrifugieren des Präzipitats.

Ein Nachteil der Filtertrennung besteht darin, daß bei der Verarbeitung mancher Tierseren und lipämischer Human-

seren ein Absaugen durch die Filter nicht möglich ist. Eine Verdünnung dieser Seren kommt zur Zeit wegen der geringen Empfindlichkeit des Assays nicht in Frage. Hauptsächlich aus diesem Grund haben wir versucht, optimale Bedingungen für die Abtrennung des Präzipitats in der Zentrifuge zu ermitteln.

Der Ansatz entspricht dem oben angeführten für die Filtertrennung mit folgenden Unterschieden: die Inkubation erfolgt in 12 x 75 mm Polystyrolröhrchen, die für die Inkubation mit Parafilm verschlossen werden. Die Röhrchen werden 20 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Röhrchen werden verschlossen und die antikörpergebundene Aktivität im Gammazähler bestimmt.

Versuchsweise wurde das Präzipitat zweimal mit 0,6 ml Haemaccel^R gewaschen und zentrifugiert. Die N-Werte konnten damit zwar gesenkt werden, aber die Variationskoeffizienten der Dreifachproben stiegen an. Möglicherweise wird durch das dreimalige Absaugen der manuelle Fehler größer als der Gewinn an Genauigkeit durch das Nachspülen der Probengefäße.

Die N-Werte bei dieser Trennmethode liegen bei 1 bis 6 % der Gesamtaktivität. Wir haben die Trennung auch zum Vergleich unter sonst gleichen Bedingungen in der Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt, die Ergebnisse waren nur unwesentlich besser, so daß wir für Routinezwecke die für uns arbeitstechnisch sehr viel einfachere Zentrifugation ohne Kühlung gewählt haben.

8.3 Trennung mit dextranbeschichteter Kohle

Aktivkohle, die mit Molekülen einer bestimmten Größe beschichtet ist, hat die Fähigkeit, in sehr kurzer Zeit kleine Moleküle (z.B. Hormone) zu adsorbieren, während größere Moleküle (z.B. ein Antikörper-Hormon-Komplex) nicht gebunden werden (11, 20, 43, 44).

Die Kohle-Dextran-Suspension wird mit Puffer II (28) hergestellt. 5 g Aktivkohle werden in 100 ml Puffer aufgeschwemmt; 0,5 g Dextran werden in 100 ml Puffer gelöst, dann werden beide Flüssigkeiten zusammengegeben und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor jeder Verwendung wird die Suspension mindestens 10 Minuten mit dem Magnetrührer gerührt.

Die Proben werden in Polystyrolröhrchen pipettiert und inkubiert wie für die Doppelantikörpermethode angegeben. Nach insgesamt 6 Tagen werden anstelle des zweiten Antikörpers zu den Proben (Inkubationsvolumen 0,5 ml) mit einer Hamiltonspritze 0,5 ml Kohle-Dextran-Gemisch zugegeben, die Proben werden etwa 1 Minute im Ständer geschüttelt und dann 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Röhrchen verschlossen und die an die Kohle gebundene freie Aktivität gezählt. Auch für die Kohletrennung bietet die Kühlzentrifuge keine Vorteile. Die Trennung mit dem Kohle-Dextran-Gemisch eignet sich für die Austestung der spezifischen Antiseren, die in sehr geringen Verdünnungen eingesetzt werden müssen; damit ist es nicht notwendig, bei jeder Verdünnungsstufe eine andere Konzentration des zweiten Antikörpers und des Trägerglobulins einzusetzen. Weiterhin hat sich die Methode bewährt für die Prüfung der Elutionsfraktionen im Antikörperüberschuß.

Weitere Untersuchungen werden zeigen, inwieweit Dextran durch Plasma zu ersetzen ist, wie sich verschiedene Kohlenkonzentrationen auswirken und ob diese Methode für die Austestung von Seren geeignet ist (5, 40).

8.4 Trennung mit Polyäthylenglykol (PEG)

Polyäthylenglykol präzipitiert die Gammaglobuline einer Lösung (10, 12, 27) und kann damit zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Peptid verwendet werden.

Die Trennung gelingt besser, wenn die Proben eine Mindestmenge an Gammaglobulinen enthalten, die größer ist als die mit dem 1. Antikörper zugesetzte Menge. Die Spezies, von denen die Gammaglobuline stammen, ist dafür nicht von Bedeutung.

Die Proben werden pipettiert und inkubiert wie unter 8.2 angegeben. Unmittelbar vor Zugabe des PEG werden zu allen Proben, die kein Serum enthalten, 100 µl Kälberserum, 1:2 verdünnt mit Puffer I, pipettiert. Von PEG wird eine 35 %ige Lösung (w/v) in Puffer I hergestellt und die gleiche Menge pipettiert, die als Inkubationsvolumen in den Gefäßen enthalten ist. Mit der 17,5 %igen PEG-Endverdünnung läßt sich für unsere Zwecke eine optimale Präzipitation erzielen. Die Proben werden auf dem Rotationsmischer gründlich geschüttelt und sofort bei 5000 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Röhrchen verschlossen und die antikörpergebundene Aktivität im Gammazähler bestimmt.

Abb. 16 zeigt, daß die Ergebnisse der drei Trennmethoden gut vergleichbar sind.

9 Berechnungen zum Assay

Bei den ausgedruckten Impulsangaben am Teleprintgerät sind die Backgroundwerte des Gammazählers abgezogen.

Berechnungen für rein experimentelle Versuche dieser Arbeit wurden mit einem Olivetti-Tischcomputer P 101 mit Rechenprogrammen durchgeführt.

Die Grundlage der Auswertung radioimmunologischer Daten ist die Standardkurve (4, 14, 48). Die Konzentrationen des zugegebenen unmarkierten Antigens werden im allgemeinen in logarithmischem Maßstab auf der Abszisse angegeben. Für die Berechnungen der Werte der Ordinate gibt



Abb. 16

es zahlreiche Möglichkeiten, aus denen wir als eine der gebräuchlichsten die Berechnung der Prozentzahl der am Antikörper gebundenen Impulszahl B bezogen auf die Impulszahlen der maximalen Bindung im jeweiligen Versuch (B_0) als 100 % gewählt haben.

Für Proben mit unbekanntem Peptid B-Gehalt wird ebenfalls die prozentuale Bindung bezogen auf B_0 berechnet. An der Standardkurve kann dann der zum jeweiligen Ordinatenwert gehörende Peptid B-Gehalt an der Abszisse abgelesen werden.

Aus den Impulszahlen der Gesamtaktivität, der B_0 -Werte und den Dreifachproben der übrigen Werte wird jeweils der Mittelwert berechnet und in die folgenden Rechnungen eingesetzt.

Bei der Kohletrennung entsprechen die gemessenen Impulszahlen der freien Aktivität (F), die Werte für die antikörpergebundene Aktivität B werden aus $GA-F$ berechnet und in die folgenden Rechenformeln eingesetzt.

Es erleichtert uns den Vergleich von Standardkurven, die mit den verschiedenen Trennmethode erstellt werden, wenn wir von allen antikörpergebundenen Impulszahlen die N-Werte des jeweiligen Ansatzes abziehen, also die Formel

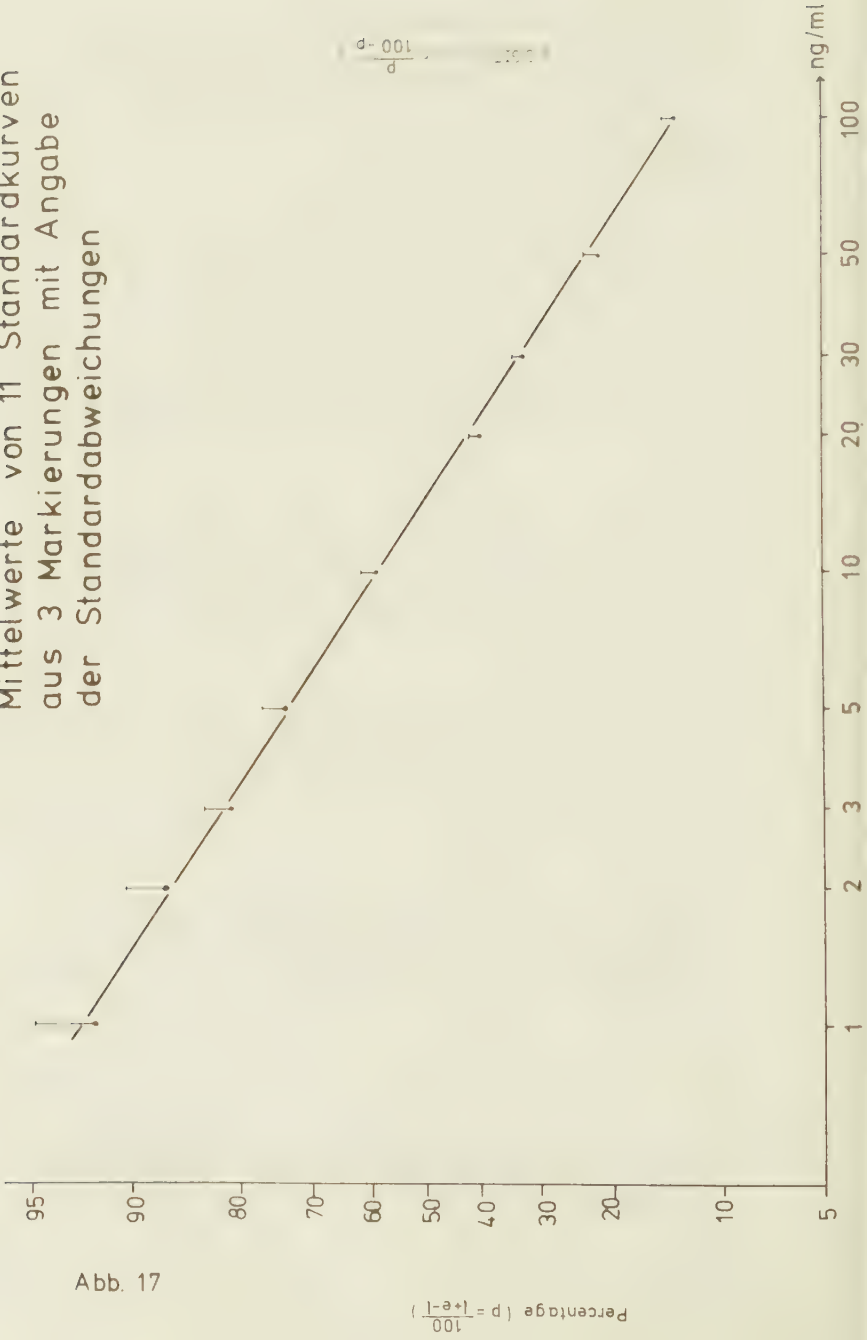
$$\frac{B - N}{B_0 - N} \cdot 100 (\%)$$

verwenden. Bei einigen experimentellen Kurven mit sehr unterschiedlichen B_0 -Werten werden die Prozentzahlen der Standardkurven auf die Gesamtaktivität bezogen nach der Formel

$$\frac{B - N}{GA - N} \cdot 100 (\%) \quad (\text{Abb. 8})$$

Abb. 17 zeigt, daß der Mittelteil der S-förmigen Standardkurve ohne weiteres mit der Logit-Transformation eine Gerade ergibt.

Mittelwerte von 11 Standardkurven
aus 3 Markierungen mit Angabe
der Standardabweichungen



Mittelwerte von 11 Standardkurven aus 3 Markierungen mit Angabe der Standardabweichungen

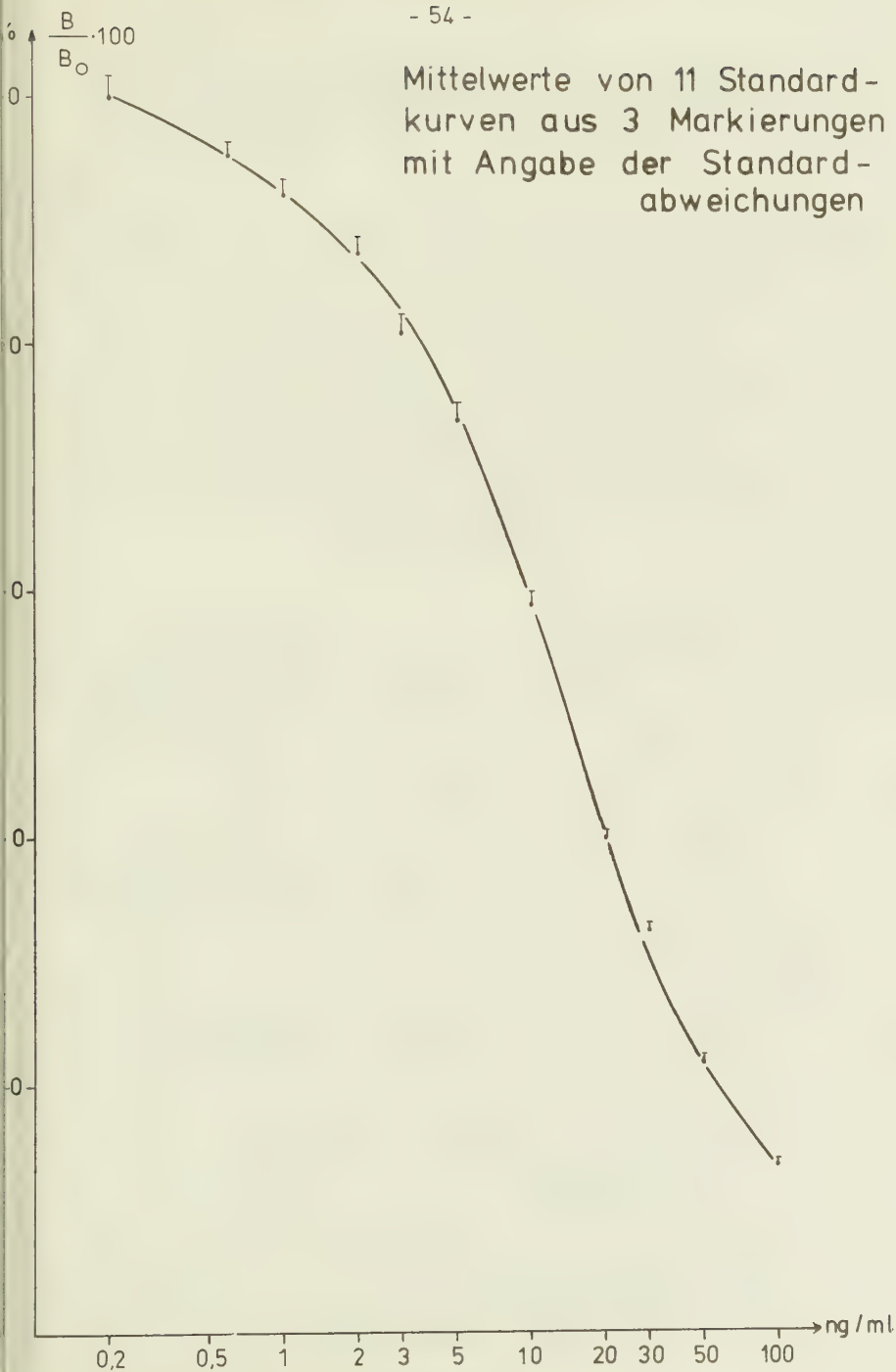


Abb. 18

In die Olivetti-Programmkarten ist die Berechnung der Variationskoeffizienten (VK) der Impulszahlen aufgenommen.

$$VK = \frac{s}{\bar{x}}$$

Messungen von Proben, bei denen der VK der Dreifachproben 10 % übersteigt, werden wiederholt.

Die Computer-Auswertung einiger Ansätze wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Marschner von der Abteilung für klinische Chemie und Endokrinologie der II. Medizinischen Klinik (Leitung Prof. Dr. Scriba) der Universität München mit Hilfe der Spline-Approximation durchgeführt. Für jeden Meßpunkt der Standardkurve wird die Höhe der Standardabweichung s_x eingezeichnet.

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Die Angabe des 50 %-Intercept (Peptidmenge bei 50 % Bindung) dient dem Vergleich der Standardkurven untereinander. Abb. 19 zeigt ein Beispiel einer Standardkurve, die mit Hilfe der Spline-Approximation berechnet wurde.

10

Einflüsse auf die Empfindlichkeit des Assays

Die Empfindlichkeit der radioimmunologischen Methode wurde definiert als "die kleinste Menge von unmarkiertem Hormon, die von nicht vorhandenem Hormon unterschieden werden kann" (16).

Die wichtigsten Faktoren, die die Empfindlichkeit eines Assays beeinflussen, werden hier besprochen:

1. das Antiserum
2. das markierte Antigen
 - a) spezifische Aktivität und Qualität
 - b) Konzentration
 - c) Aufbewahrung des Tracers
3. die Inkubation
 - a) kalte Vorinkubation
 - b) Verlängerung der Inkubationszeit.

Berechnung einer Standardkurve mit Hilfe von Spline-Approximation

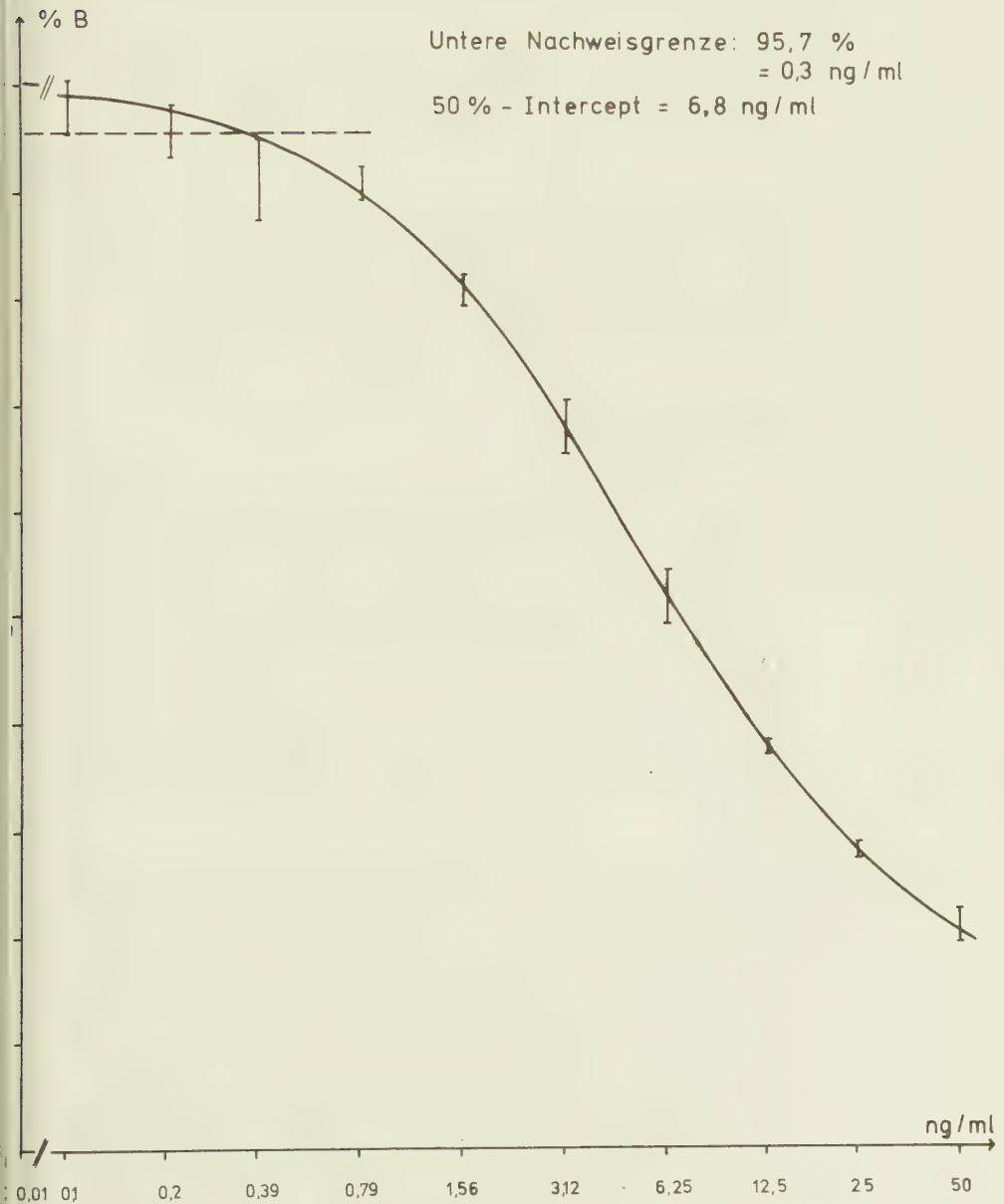


Abb. 19

In Abschnitt 7 ist dargelegt, daß wir diese letztgenannten Faktoren bei der Auswahl der Inkubationsmethode belegt und berücksichtigt haben.

Nicht untersucht wurden die Möglichkeiten der Vergrößerung des Volumens des untersuchten biologischen Materials und die Extraktion des Peptids aus Serum.

10.1 Antiserum

Der größte Teil der bisherigen Versuche wurde mit den Antiseren III und XXII (Abb. 3) durchgeführt, von denen das zweite schon eine echte Verbesserung der Empfindlichkeit brachte. Die untere Nachweisgrenze konnte von 2 ng/ml auf 0,5 ng/ml gesenkt werden.

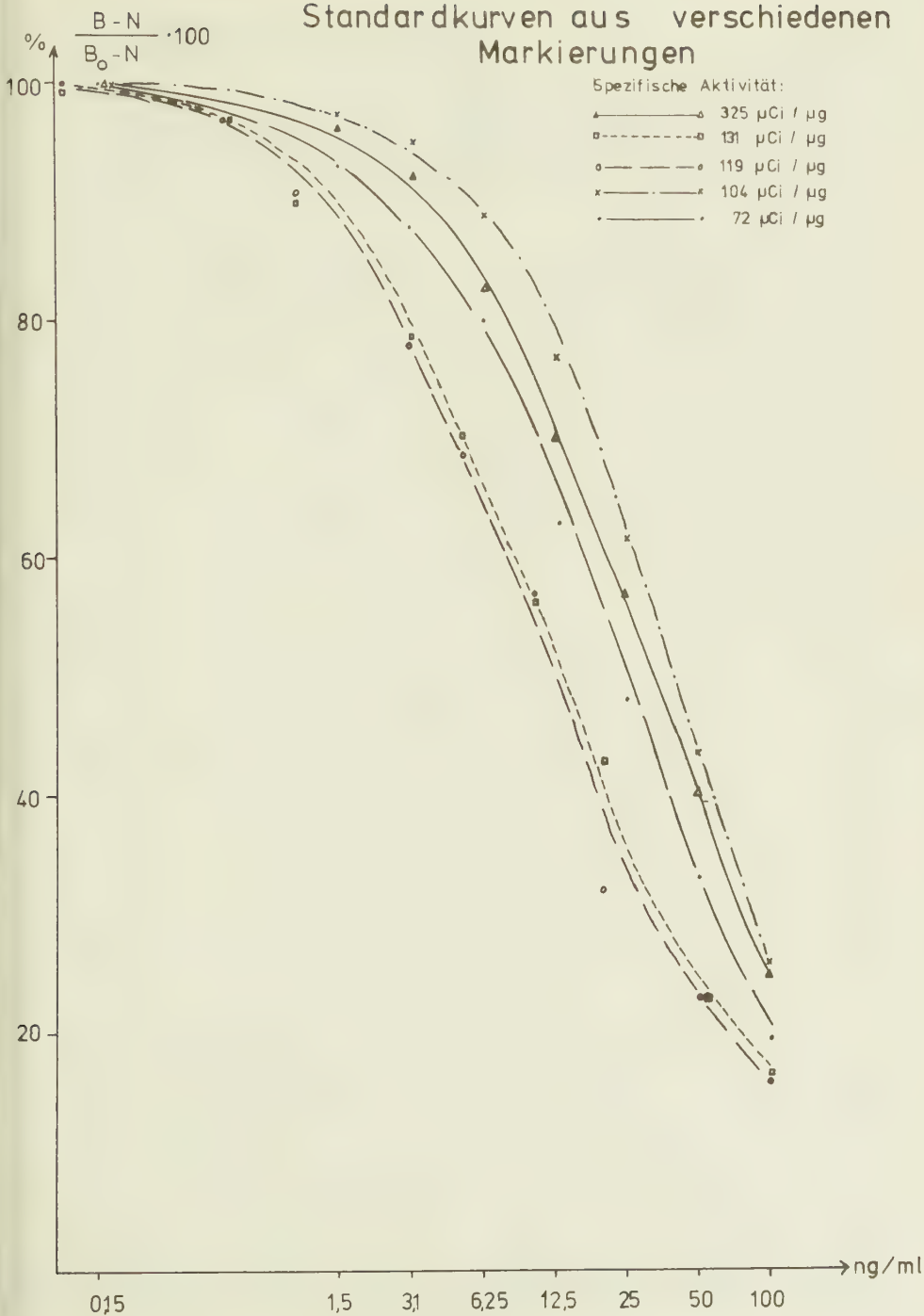
10.2 Markiertes Antigen

10.2.1 Spezifische Aktivität

In Abb. 20 sind Standardkurven miteinander verglichen, die mit den Fraktionen verschiedener Markierungen aufgestellt wurden, die im Vorversuch jeweils die höchste Bindungsfähigkeit im Antikörperüberschuß gezeigt hatten. Eine sichere Schlußfolgerung, daß etwa hohe oder niedrige spezifische Aktivität für sich alleine eine Verbesserung der Empfindlichkeit bringen, läßt sich daraus nicht ziehen. Es ist wahrscheinlich, daß im Markierungsvorgang neben der spezifischen Aktivität noch andere Qualitätsmerkmale des markierten Peptids determiniert werden.

Ein Vergleich der Immunoreaktivität gleicher Mengen markierten und unmarkierten Peptids wurde nach einem Vorschlag von HUNTER (24) bei zwei Markierungen mit Antiserumverdünnungskurven (Abb. 21 und 22) durchgeführt: Unter gleichen Bedingungen und bei vergleichbarer spezifischer Aktivität läßt sich die sehr verschiedene Immunoreaktivität nur so erklären, daß das Peptid der Abb. 21 durch die Markierung immunologisch geschädigt war, während der Tracer der Abb. 22 durch die Markierung

Standardkurven aus verschiedenen Markierungen



Antiserumverdünnungs- kurve XXII

Spezif. Akt. 129 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$

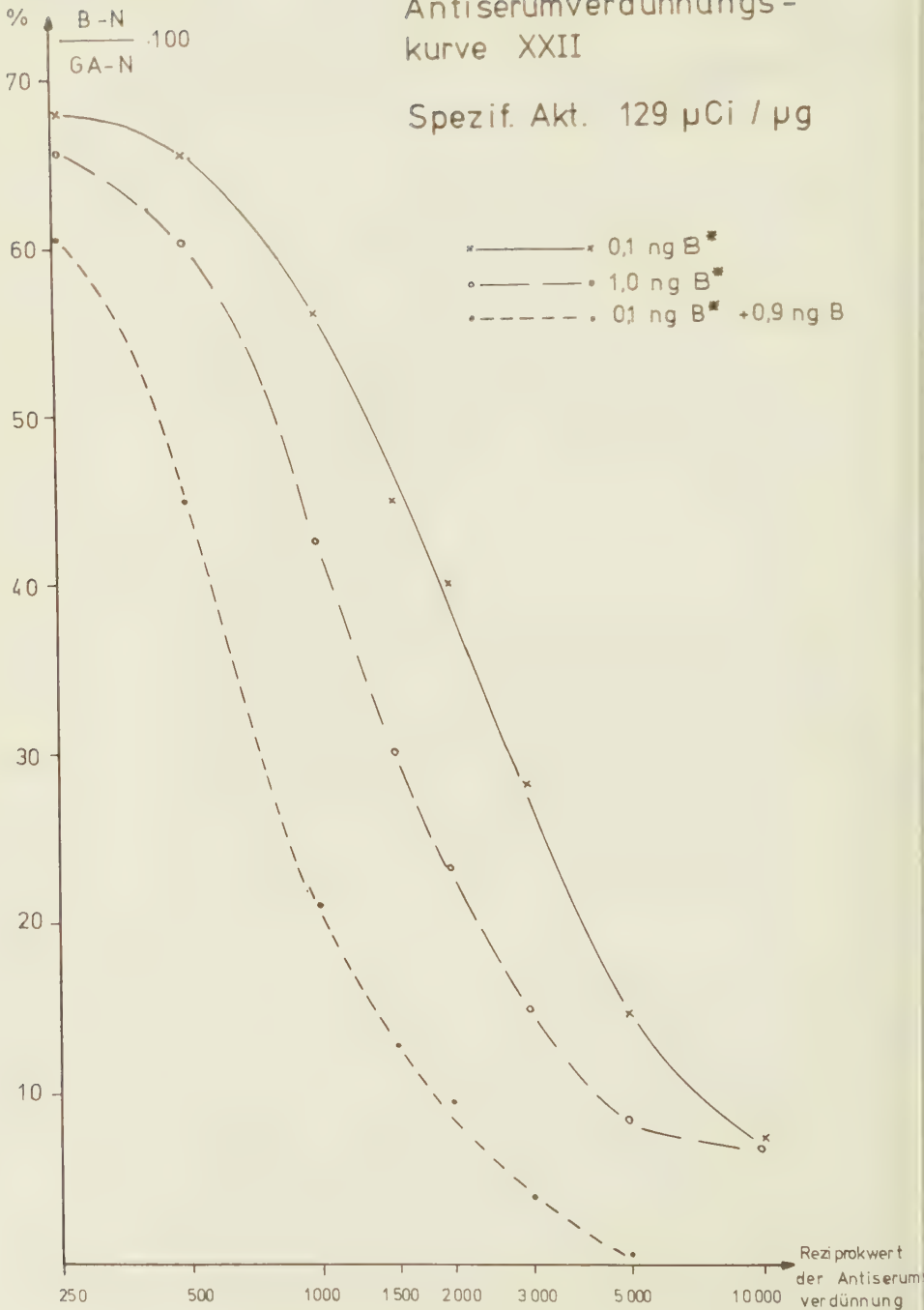


Abb. 21

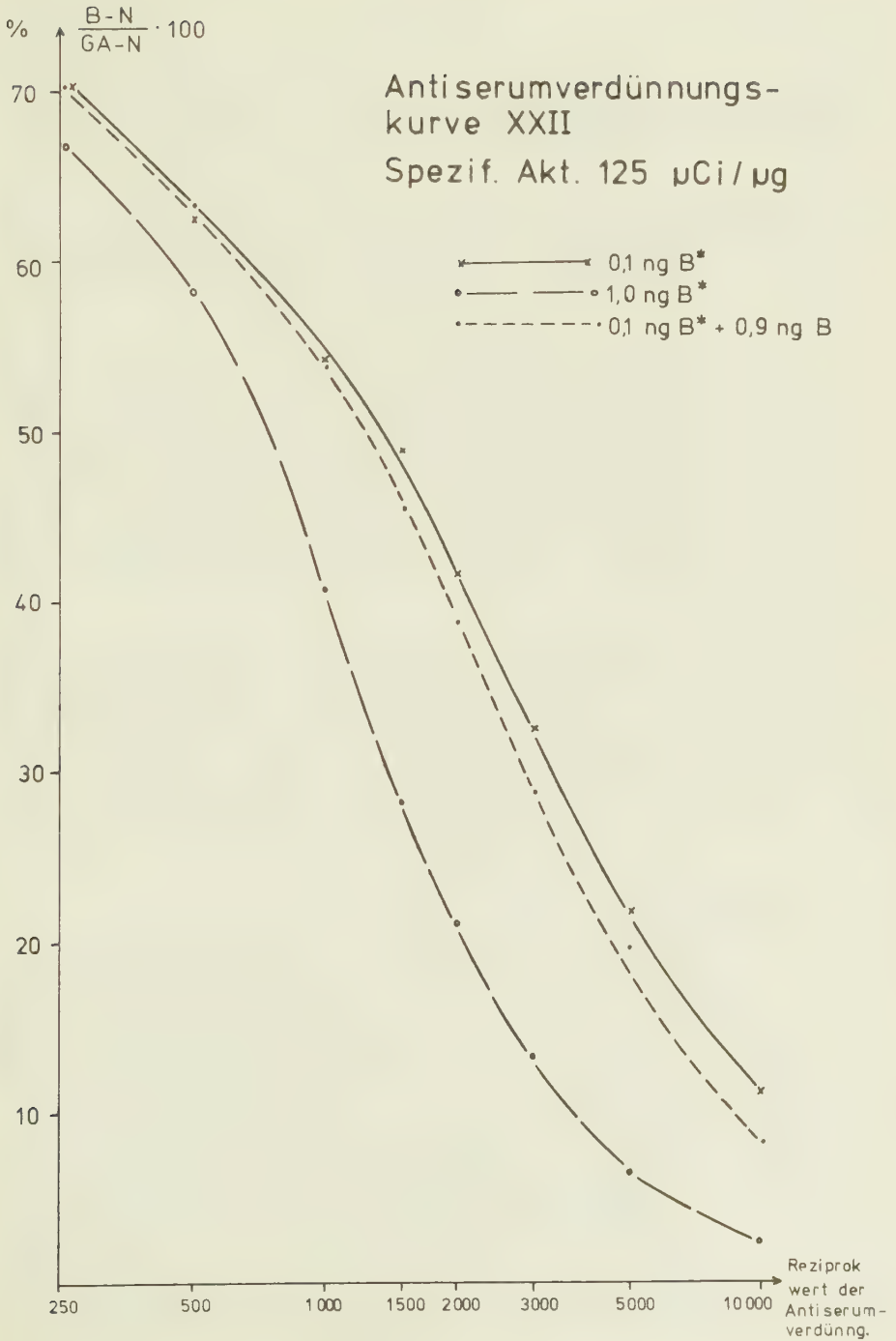


Abb. 22

so verändert wurde, daß er immunologisch stärker reagiert als unmarkiertes Peptid B (24, 57).

10.2.2 Tracerkonzentration

Zur Bestimmung von B_0 -Werten wurde die Tracerkonzentration von 1.000 pg bis 62 pg je Probe variiert, die Bindungsfähigkeit änderte sich nur gering (4).

Bei den bisherigen Versuchen wurden Tracerkonzentrationen von etwa 70 pg bei hohen spezifischen Aktivitäten, von 100-200 pg bei niedrigen spezifischen Aktivitäten eingesetzt, der Verlauf der Standardkurven steht in keiner direkten Abhängigkeit von diesen Konzentrationsschwankungen. Abb. 23 zeigt erst bei einer Erhöhung um das Achtfache eine deutliche Abweichung mit geringerer Empfindlichkeit der Kurve mit der höheren Tracermenge.

Solange die basale Serumkonzentration und damit der wünschenswerte Meßbereich des Peptid B-Assays nicht bekannt sind, läßt sich nicht entscheiden, ob wir die Tracermenge entscheidend reduzieren müssen. Wenn etwa die Serumkonzentrationen regelmäßig unter 1 ng/ml zu suchen wäre, wären wir gezwungen, die Zählzeiten zu erhöhen und evtl. die Versuche mit Markierungen mit höheren spezifischen Aktivitäten fortzusetzen.

10.2.3 Aufbewahrung des Tracers

Standardkurven, die bis zu 4 Wochen nach der Markierung aufgestellt wurden, waren untereinander gut vergleichbar. Dazu war der Tracer in der Endverdünnung bei -20°C eingefroren und erst am Tag der Verwendung aufgetaut worden.

Abb. 24 zeigt zwei Standardkurven aus der gleichen Markierung. Der Tracer der Kurve A war 4 Wochen in der Endverdünnung eingefroren, bei Kurve B war er nach der ersten Auftrennung mit dem gleichen Volumen 5 % BSA-Puffer eingefroren und 4 Wochen später rechromatographiert worden.

Elektrophoresen des markierten Peptids (Abb. 25) zeigen,

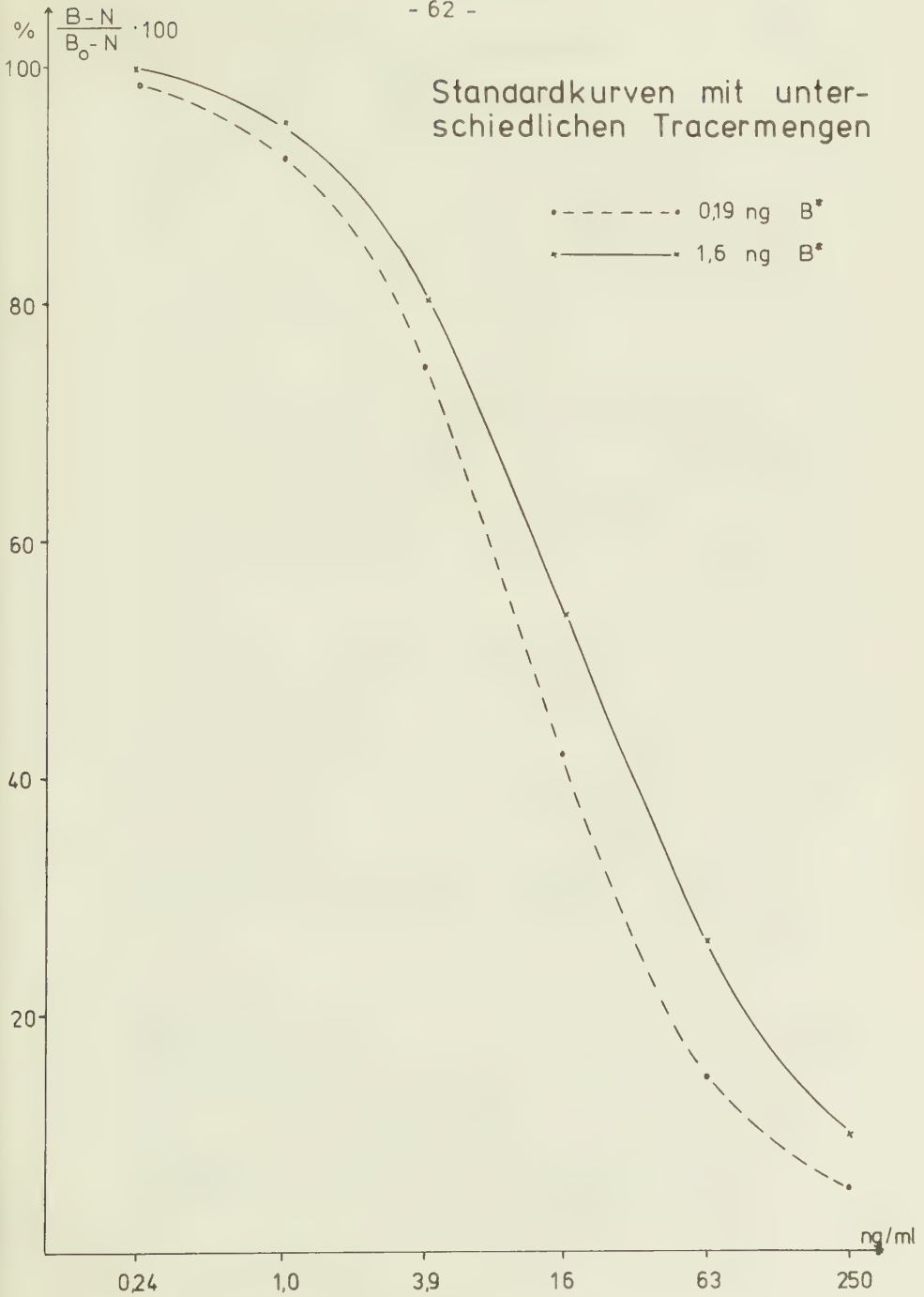


Abb. 23



Abb. 24

daß während der dreiwöchigen Lagerung sich der Anteil des beschädigten Peptids (schraffiert dargestellt) von 1,7 auf 13,8 % erhöht hat, der Anteil an freiem Jod ist um 8 % gestiegen. Wie aus der Abbildung weiter hervorgeht, spielt auch die Lagerungstemperatur eine entscheidende Rolle: Bei 4° C betrug die Menge an intaktem Peptid nur mehr 20 % gegenüber 72 % bei gleich langer Aufbewahrung bei -20° C.

Für die Routine ergeben sich folgende Konsequenzen: Bis zu 4 Wochen nach der Markierung kann der Tracer verwendet werden, wenn er unmittelbar nach der Rechromatographie in der Endverdünnung bei -20° C eingefroren wird. Ein Teil der Gipfelfraktion des Peptidpeaks der ersten Auftrennung wird im gleichen Volumen Puffer III bei -20° C eingefroren und erst nach einigen Wochen rechromatographiert.

Zusammenfassend läßt sich zur Empfindlichkeit des Assays zum gegenwärtigen Zeitpunkt sagen, daß die Meßgenauigkeit im Bereich von 0,5 bis 12 ng/ml als gut bezeichnet werden kann, wenn auch weiterhin die Erzeugung eines potenteren Antikörpers anzustreben bleibt. Eine Lagerung des Tracers bei -20° C ist in der Endverdünnung über 4 Wochen möglich. Mittlere Tracerkonzentrationen von ca. 100 pg B ergeben reproduzierbare Standardkurven. Unterschiede im Verlauf der Standardkurven stehen nicht im direkten Zusammenhang mit der spezifischen Aktivität.

Spezifität des Assays

Spezifität ist der Grad der Ausschließlichkeit, mit dem das geprüfte Antigen im Untersuchungsmaterial nachgewiesen wird. Sie wird determiniert von den Antigen-Bindungsstellen des verwendeten Antiserums (2, 16). Alle Bestandteile des untersuchten Materials, die mit dem markierten Antigen um die Antikörperbindungsstellen

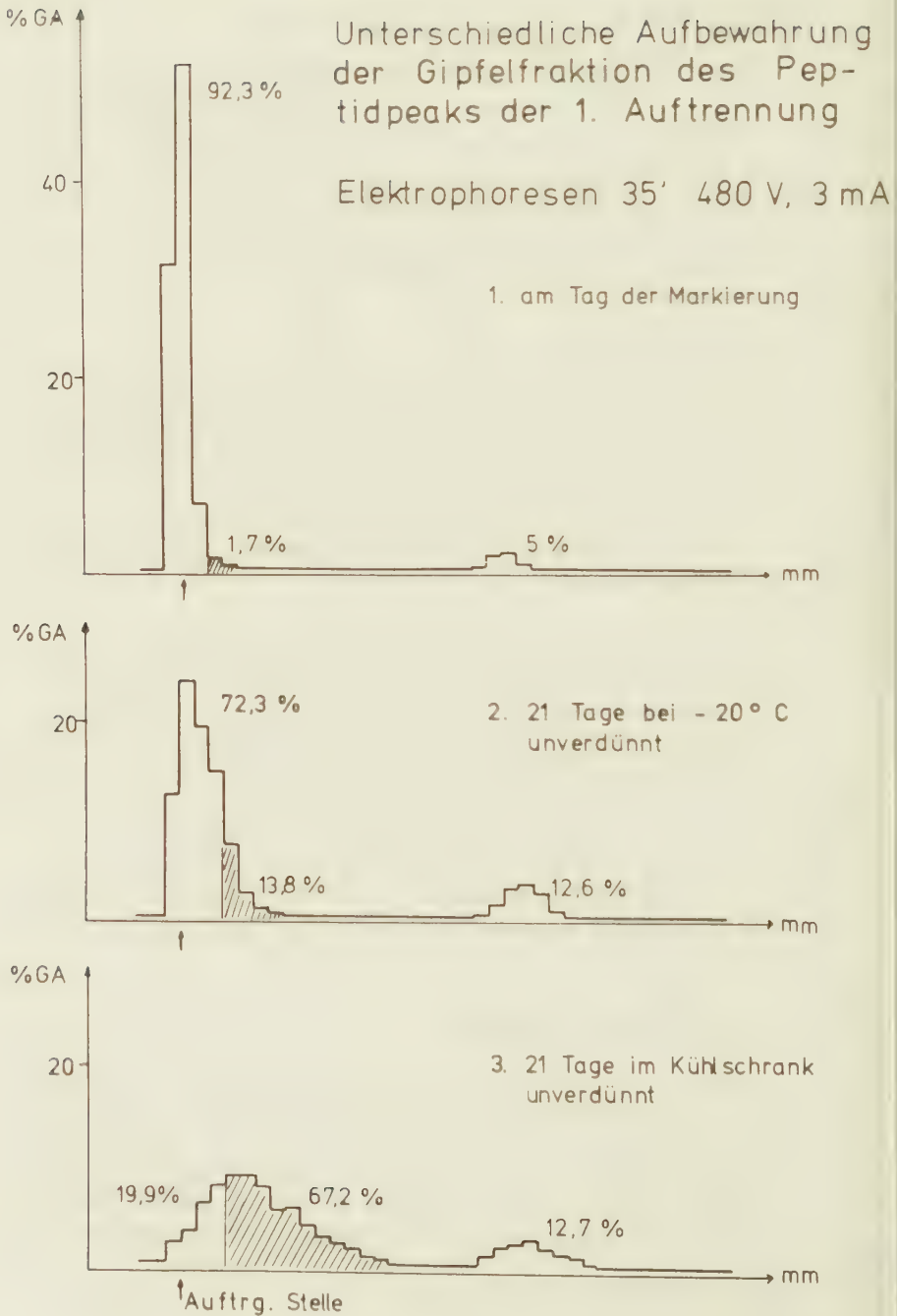


Abb. 25

konkurrieren, können eine Kreuzreaktion hervorrufen und evtl. das Meßergebnis verfälschen.

Kreuzreaktionen können hervorgerufen werden

1. durch analoge Reaktion von Hormonen verschiedener Spezies, z.B. bei Immunisierung mit Rinderinsulin für einen Assay zur Messung von Humaninsulin. Mit dieser Methode können heterologe Radioimmunoassays aufgestellt werden;
2. durch strukturelle Ähnlichkeiten von Hormonen verschiedener biologischer Funktion, z.B. ACTH-MSH. Solche Hormone reagieren mit identischen Antikörper-Bindungsstellen und können zu Fehlbestimmungen führen;
3. durch Reaktion der Präkursoren, Abbauprodukte oder auch pathologischer Tumorprodukte;
4. durch Reaktion temporärer Hormone, z.B. Placenta-Choriongonadotropin im Radioimmunoassay entsprechender Hypophysenhormone.

11.1 Methode der Prüfung

Die Prüfung der Spezifität des Assays für Peptid B wurde mit allen verfügbaren Hypophysenhormonen vorgenommen. Die Untersuchungen wurden mit dem Antiserum III durchgeführt, das in Abb. 2 und 3 charakterisiert ist. Von den lyophilisierten Hormonen und von Peptid B 23 als Referenzsubstanz wurden je 100 µg abgewogen und mit Puffer III Verdünnungsreihen mit insgesamt 20 Konzentrationen von 10.000 ng/ml bis 0,1 ng/ml hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden in 0,5 ml Portionen bei -20° C eingefroren, dazu Lösungsmittelproben für die B_0 -Werte und die N-Werte. Einige Hormone, die wir in gelöstem Zustand erhielten, wurden unmittelbar vor dem Einsetzen in den Assay aufgetaut und entsprechend weiterverdünnt. Die Inkubation erfolgte wie auf Seite 41 angegeben, die Proben wurden über Filter getrennt.

11.2 Untersuchte Hormone und Ergebnisse

Die unter Nummer 1 bis 10 aufgeführten Hormone zeigten bis zur Konzentration von 10.000 ng/ml keine Kreuzreaktion.

1. α -MSH, synthetisch, HOECHST
Op 862/II/1-8
2. Corticotrophin ¹⁻²⁴ Synacthen^R
synthetisch, CIBA
3. ACTH ¹⁻²³ Corticotrophin,
synthetisch, CIBA
4. FSH, human, KABI, Lot No. 19157
5. TSH, human, KABI, Lot No. 19168
6. HPL, human, NIH
7. LH, human, KABI, Lot No. DcB 16 A
8. LH, Schwein, NIH, LER-778-4
9. Prolactin, Schwein, NIH
10. HV-Diabetogenic Factor, Rind, LOUIS

Für die folgenden Hormone ließ sich eine Kreuzreaktion nachweisen ab:

11. LH, human, NIH, LER-960	5000 ng/ml
12. FSH, human, NIH, LER-1557 C	2000 ng/ml
13. β -LPH, Schaf, CHRETIEN	1000 ng/ml
14. Peptid A, Schwein, SCHWANDT	1000 ng/ml
15. ACTH, Schwein, SCHERING U-Nr. 5991/73	1000 ng/ml
16. FSH, Schwein, NIH	300 ng/ml
17. LMF, Schwein, TRYGSTAD, HPG 47	300 ng/ml

FSH = Follikelstimulierendes Hormon

HPL = Human Placental Lactogen

NIH = National Institutes of Health (Bethesda, Maryland,
USA)

LH = Luteinisierendes Hormon

LPH = Lipolytisches Hormon

LMF = Lipid Mobilizing Factor

Vergleich verschiedener Hormone aus Schweinehypophysen mit Peptid B

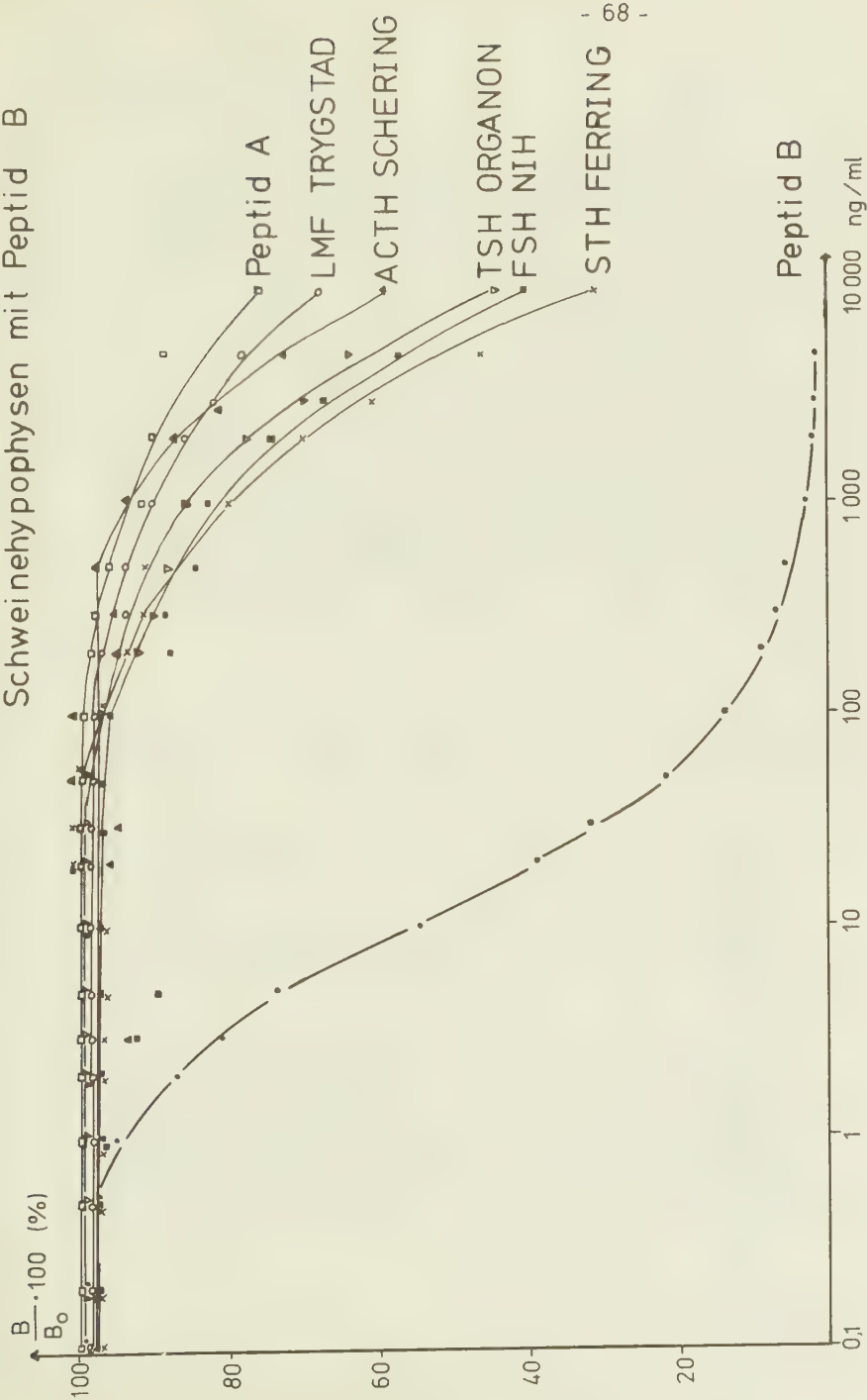
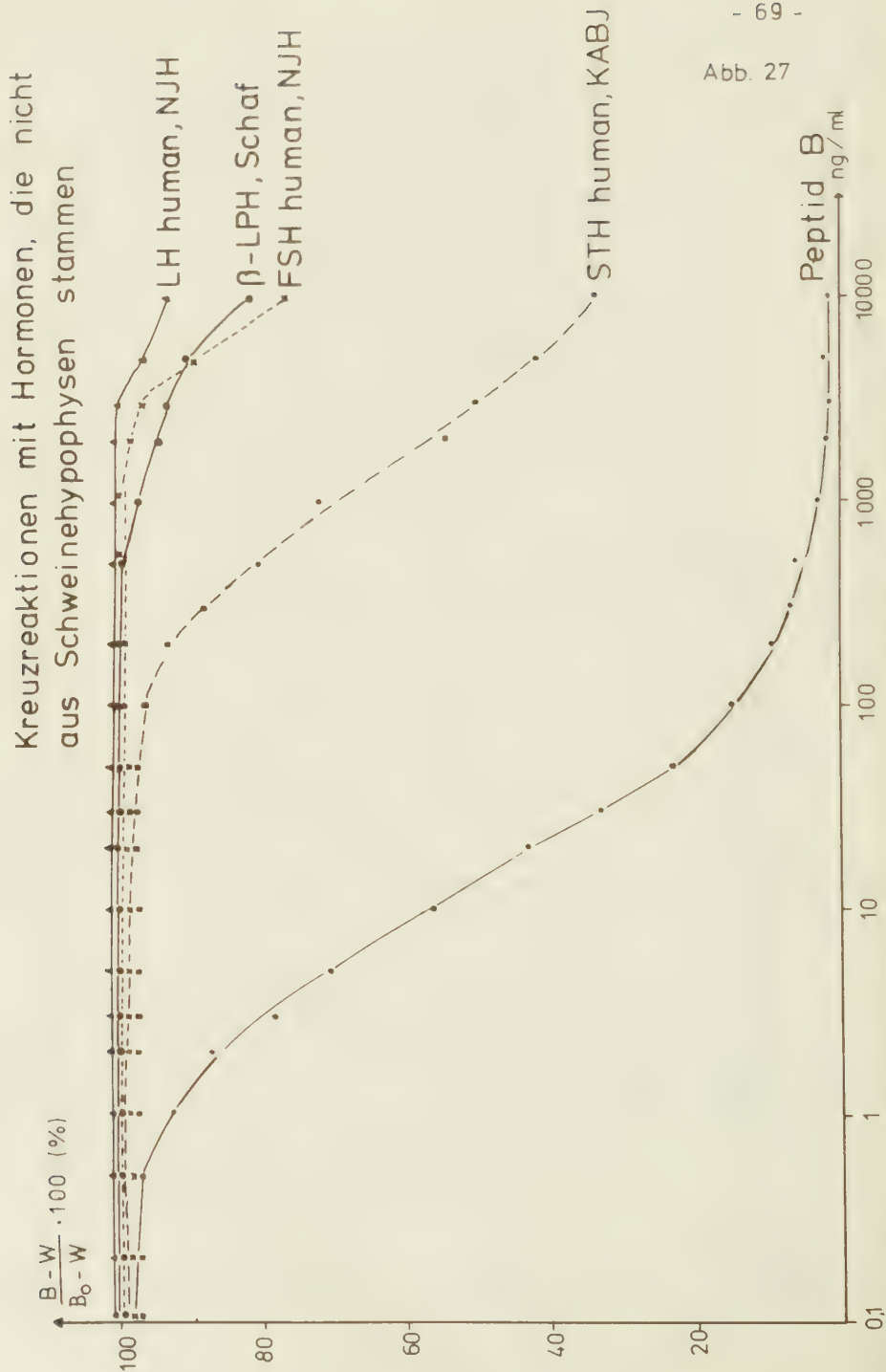


Abb. 26

Abb. 27



18. STH, human, KABI	200 ng/ml
19. STH Somactin ^R , Schwein, FERRING	200 ng/ml
20. TSH Thyreostimulin ^R , Schwein, ORGANON, Charge 631226	200 ng/ml
21. ACTH 1-39, Schwein, CIBA	200 ng/ml
22. Neurophysin, Schwein, TRYGSTAD, HGH: 2 = PGH 10:11	2 ng/ml

STH = Somatotropes Hormon

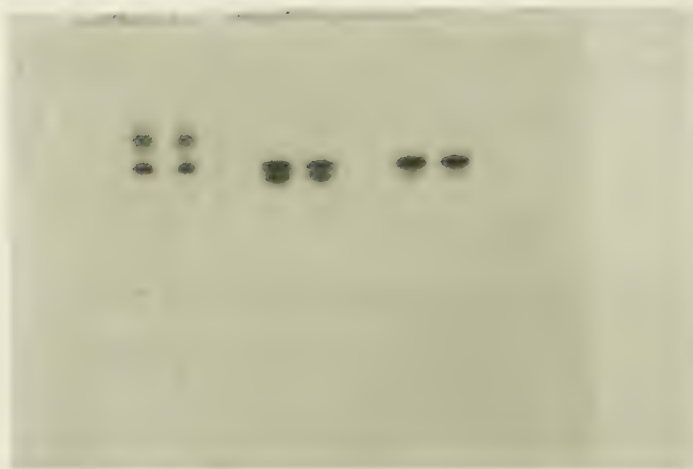
Für die Überlassung von Hormonsubstanzen sei an dieser Stelle gedankt:

Herrn Dr. Müller, II. Med. Klinik der Univ. München;
Herrn Dr. Riosk, I. Frauenklinik der Univ. München;
Herrn Dr. Schams, Weißenstephan; Prof. Chrétien, Montreal;
Dr. Trygstad, Oslo; Prof. Louis, Ann Arbor, Michigan;
Dr. Holmström, Stockholm; Dr. Reichert, Atlanta, USA.

Außer bei Neurophysin liegen alle Kreuzreaktionen oberhalb des Meßbereiches des Assays für Peptid B (Abb. 26 und 27).

Da uns leider nicht alle untersuchten Hormone in ausreichend reiner Form zur Verfügung standen (53), läßt sich nicht sagen, inwieweit Kontaminationen als Ursache für die Kreuzreaktionen im Peptid B-Radioimmunoassay anzusehen sind.

Zumindest für das gut kreuzreagierende Neurophysin erscheint das nicht ausgeschlossen: Der in der horizontalen analytischen Acrylamidgelelektrophorese durchgeführte Vergleich (Abb. 28) mit einer noch nicht weitgereinigten Vorstufe der Peptid B-Präparation ergab neben der Bande im Peptid B-Bereich weitere, deutlich langsamer wandernde Banden.



Neurophysin

F 162 a

F 162 b

Abb. 28

Messungen in biologischem Material

Entsprechend der Aufgabenstellung (Aufbau einer radioimmunologischen Nachweismethode für das lipolytische Peptid B aus Schweinehypophysen) dieser Arbeit, haben diese Untersuchungen lediglich rein orientierenden Charakter.

12.1 Bestimmung des Peptid B-Gehaltes von Schweineseren.

Dafür standen uns folgende Seren zur Verfügung:

2 Seren von 12 Wochen alten, etwa 25 kg schweren Hanford-Miniatur-Schweinen, 1 Serum von einem Schwein, das 9 Monate alt und etwa 100 kg schwer war, 1 Serum von einem Schwein mit dem gleichen Gewicht, dem vor der Blutentnahme zur Beruhigung Stresnyl^R (Azaperon) gespritzt wurde. Den vier Tieren wurde einmal nach einer Nüchternperiode von 12 Stunden und einmal nach einer Nüchternperiode von 36 Stunden Blut aus der Vena jugularis entnommen. Von vier 12 Wochen alten Hanford-Miniatur-Schweinen wurde einmal Blut unmittelbar nach der Fütterung, dann nach 12 Stunden und nach 36 Stunden Futterentzug abgenommen.

Für die Blutentnahme und die Mitarbeit sei hier den Mitarbeitern von Prof. Kalich vom Institut für Tierhygiene der Universität München herzlich gedankt.

Vom Schlachthof München haben wir von 16 Schweinen größere Serummengen zur Verfügung. Von diesen Tieren fehlen uns allerdings Angaben über Alter, Gewicht und Zeitpunkt der letzten Fütterung.

Alle Seren wurden nach der Gerinnung bei Zimmertemperatur zentrifugiert und ohne Zusätze in Eppendorfgläsern oder Polystyrolröhrchen bei -20°C eingefroren. Der Peptid B-Gehalt dieser Seren wurde mehrmals mit der Doppelantikörpermethode mit Zentrifugentrennung bestimmt.

Antiserum XXII hat in der Verdünnung von 1 : 1200 eine untere Nachweisgrenze von 0,5 ng/ml. Damit sind immer noch 28 Schweineseren von 36 unterhalb der Meßgrenze des Assays. Das Serum mit dem höchsten Gehalt (Mittelwert 15 ng/ml) stammt von einem Schwein, dem vor der Blutentnahme Stresnyl^R gespritzt wurde.

Da wir bisher das Vollblut nach der Abnahme nicht sofort gekühlt und keine Gerinnungshemmer zugesetzt haben (7, 34, 56), können wir nicht ausschließen, daß vorhandenes Peptid B (z.B. durch Peptidasen oder Gerinnungsvorgänge) im Serum abgebaut war, als wir es in den Assay einsetzten. Einen Hinweis darauf, daß möglicherweise hochaktive Peptidasen das Peptid schnell abbauen, haben wir aus einem Versuch mit isolierten Hepatocyten, bei dem in 30 Minuten 98 % des zugesetzten Peptid B abgebaut waren.

12.2 Messung in Hypophysenextrakten

Geräte und Reagenzien:

Cellophan-Dialysierschlauch Kal. 16, Porengröße 25-80 Angström, Durchlässigkeit bei einem Molekulargewicht von 9000
(Fa. Kalle AG, Wiesbaden)

physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4

Ammoniumhydroxid 0,1 M, pH 8,6

Kochsalzlösung 2 %, pH 7,3.

Schweinehypophysen wurden unmittelbar nach dem Schlachten entnommen und eingefroren. Zur Verwendung wurden sie portionsweise aufgetaut, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und lyophilisiert.

Zur Messung von Peptid B wurden folgende Extrakte hergestellt:

- a) 4 Schweinehypophysen wurden in lyophilisiertem Zustand gewogen, im Mörser zerkleinert, mit physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,3, 2 Stunden lang mit

dem Magnetrührer gerührt, 15 Minuten bei 18.000 rpm (30.000 g) bei 4° C zentrifugiert, der Überstand über Nacht gegen aqua dest dialysiert und dann lyophilisiert. Der Extrakt wurde in 3 ml Puffer gelöst und dann in einer Verdünnungsreihe in Puffer I in den Assay eingesetzt.

In der gleichen Weise wurden Extrakte aus je einer ganzen Rinderhypophyse und einer Humanhypophyse hergestellt, darin wurde für die Rinderhypophyse eine Immunoreaktivität von 0,5 mg, für die Humanhypophyse von 0,030 mg, gemessen.

Aus Schweinehypophysen haben wir auch

- b) Extrakte mit 0,1 M Ammoniumhydroxid, pH 8,6, und zweiprozentiger NaCl-Lösung, pH 7,3, auf folgende Weise hergestellt: Nach dem Zerkleinern der Hypophysen, wie oben beschrieben, wurden sie mit 5 ml Ammoniaklösung bzw. NaCl-Lösung zwei Stunden gerührt, 15 Minuten bei 30.000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in kleinen Portionen zur Bestimmung eingefroren.

Tabelle 4

Ergebnisse der Messungen in Schweinehypophysen bei verschiedenen Extraktionsarten. (Peptid B-Menge je Hypophyse bzw. Hypophysenteil)

	Extrakt in 0,1 M Ammonium	Extrakt in 2 % NaCl	Extrakt in 0,9 % NaCl, lyophilisiert
ganze Hypophyse	1,2 mg	1,66 mg	1,56 mg

Die Verdünnungsreihen, in denen die Bestimmungen durchgeführt wurden, waren ebenfalls in Puffer I hergestellt. Anfängliche Versuche, die Verdünnungsreihen mit dem jeweiligen Extraktionsmittel herzustellen, mußten wir auf-

geben, die Lösungen verursachen große Meßfehler.
Im Ammoniumextrakt wurde pro Schweinehypophyse 1,2 mg
Peptid B gemessen, in 2 %igem NaCl-Extrakt 1,6 mg.

13

Diskussion

Der Radioimmunoassay stellt eine hochempfindliche Methode dar, die den Nachweis auch noch sehr geringer Hormonkonzentrationen erlaubt. Damit wird es möglich, Aussagen zu machen über Regulationsmechanismen, die an der Inkretion des Hormons beteiligt sind. Anders formuliert stellt dieses Verfahren eine weitere Möglichkeit dar, den Hormoncharakter einer aus einem endokrinen Organ isolierten Substanz zu belegen.

Für die zahlreichen aus Hypophysen verschiedener Spezies isolierten lipotropen Peptide ist bisher lediglich für β -Lipotropin aus Schafshypophysen (13) sowie 1975 für β - und γ -Lipotropin aus Humanhypophysen (17) ein radioimmunologisches Nachweisverfahren beschrieben worden. Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, jetzt auch für das aus Schweinehypophysen isolierte lipotrope Peptid B einen Radioimmunoassay aufzustellen. Damit ist die Grundlage geschaffen worden für die Untersuchung von Serumkonzentrationen von Peptid B im homologen System sowie dessen Sekretionskinetik.

Mit dem radioimmunologischen Nachweis steht aber auch eine weitere Methode der Abgrenzung gegenüber anderen Polypeptiden zur Verfügung. Darüberhinaus ermöglicht dieses Verfahren in Verbindung mit dem Bioassay aber auch bessere Präparations- und Reinigungsmethoden, und nicht zuletzt ist der Radioimmunoassay eine wertvolle Hilfe bei Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Strukturen des Polypeptidhormons und seinen biologischen Wirkungen. So ließ sich z.B. mit unserem Radioimmunoassay zeigen, daß das Gemisch der tryptischen Peptide von Peptid

B eine mit dem intakten Lipotropin vergleichbare Standardkurve ergab. Es konnte zwischen dem Peptid B-Effekt an isolierten Hepatocyten und der radioimmunologisch gemessenen Peptid B-Konzentration eine gute Beziehung hergestellt werden, wobei die Wiederfindekurve eine hervorragende Übereinstimmung mit der Einwaage zeigte. Weiter kann gesagt werden, daß von allen untersuchten Hypophysenhormonen lediglich Neurophysin eine im Meßbereich des Assays liegende Kreuzreaktion mit Peptid B ergab.

Somit stellt der Radioimmunoassay für Peptid B - trotz aller noch notwendigen Verbesserungen - bereits im gegenwärtigen Stadium eine wesentliche Hilfe bei den Untersuchungen zur Bedeutung des Lipotropins Peptid B dar.

Die Immunisierung mit hochgereinigtem Antigen in Emulsion mit komplettem bzw. inkomplettem Freund'schem Adjuvans wurde bisher bei insgesamt 22 Versuchstieren durchgeführt. Bei einem Molekulargewicht von rund 11.000 waren von Peptid B ausreichende Antigeneigenschaften zu erwarten, so daß wir uns zur Antikörpererzeugung mit nicht konjugiertem Antigen entschlossen. Damit ließ sich als bisher bestes Ergebnis ein Antikörper erzeugen, der eine Endverdünnung von 1 : 7.200 erlaubt, die untere Nachweisgrenze mit diesem Antiserum liegt bei 0,5 ng/ml.

Da die Empfindlichkeit des Assays sicher durch potentere Antiseren zu verbessern ist, laufen z.Zt. Immunisierungen mit nicht vollständig gereinigten Peptid B-Vorstufen, die an Thyreoglobulin gekoppelt wurden (49, 50). Dieses Vorgehen scheint uns nach den Angaben von YALOW (56) und FEIBER (16) zulässig, da alle Markierungen und Standardkurven nur mit absolut einheitlichen Peptid B-Chargen durchgeführt werden; der Vorteil liegt nicht nur in der Möglichkeit einer höheren Antigenität, sondern auch in den damit zur Verfügung stehenden größeren Mengen des Peptids.

Als Markierungsverfahren wählten wir die für zahlreiche Peptidhormone erfolgreich angewandte Chloramin T-Methode mit Tracerreinigung an Sephadex. Die Möglichkeiten, die Assay-Empfindlichkeit zu verbessern, scheinen ausgeschöpft. So ließ sich die spezifische Aktivität am besten durch Erhöhung der Peptidmenge senken. Es scheint nicht vorteilhaft, die Chloramin T-Menge kleiner als $12,5 \mu\text{g je mCi}$ und die Reaktionszeit unter 20 Sekunden zu wählen.

Hohe spezifische Aktivitäten - die höchste betrug $325 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ - wirken sich nachteilig auf die Immunoreaktivität des Tracers aus: Die B_0 -Werte lagen niedriger als gewohnt und ließen sich auch durch eine geringere Verdünnung des ersten Antikörpers nicht wesentlich verbessern. Die Dreifachproben streuten manchmal so stark, daß Standardkurven nicht verwertbar waren. Die Verdünnung des markierten Peptids schien auch stärker als sonst zu zerfallen, so daß es 3 Wochen nach der Markierung nicht mehr verwendet werden konnte.

Nach den bisherigen Ergebnissen können spezifische Aktivitäten zwischen 100 und $200 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ als geeignet bezeichnet werden. Damit alleine sind jedoch noch keine Aussagen über die Immunoreaktivität des Tracers möglich wie die Abb. 21 und 22 zeigen: Unter gleichen Bedingungen und bei vergleichbaren spezifischen Aktivitäten läßt sich die sehr verschiedene Immunoreaktivität nur mit einem unterschiedlichen Schädigungsgrad des Tracers bei der Markierung erklären.

Eine Vorselektion der gereinigten Tracer-Fractionen nach ihrer Bindungsfähigkeit im Antikörperüberschuß scheint für die Verbesserung der folgenden Versuche notwendig. Inkubation im Antikörperüberschuß für 8 - 12 Stunden mit nachfolgender Trennung mit Kohle-Dextran-Gemisch oder PEG brachte bisher die zuverlässigsten Ergebnisse.

Sie ist für diese Fragestellung besser geeignet als die Papierelektrophorese einzelner Fraktionen.

Von weiteren Versuchen mit elektrophoretischen Methoden erwarten wir auch eine Erklärung für die Befunde mit der bisherigen Methode, die nie eine Bindung über 80 % erbracht hat. Aufgrund der Elektrophoresedaten und der hohen Bindung des freien unbeschädigten Peptids an Aktivkohle zu über 95 % ist es nicht wahrscheinlich, daß in den besten Fraktionen der Rechromatographie noch über 20 % beschädigtes Peptid und freies Jod¹²⁵ vorhanden sind.

Die papierelektrophoretische Kontrolle des Tracers ist bei einem höheren Anteil an geschädigtem Peptid aussagekräftiger als das Elutionsdiagramm. Der Tracer der in Abb. 29 gezeigten Markierung war erwartungsgemäß für die Aufstellung einer Standardkurve nicht geeignet, auch nicht nach zahlreichen Modifikationen der Versuchsbedingungen.

Die schonende Markierungsmethode von Peptid B hat nicht nur für die Empfindlichkeit des Assays Vorteile, sondern auch für die Aufbewahrung des Tracers. Diese ist für 4 Wochen in der Endverdünnung möglich, so daß erst im zweiten Monat nach der Markierung eine Rechromatographie notwendig wird.

Zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Antigen ist für Peptid B die Doppelantikörpermethode mit Filter- oder Zentrifugentrennung gut geeignet. Die Versuche mit dextranbeschichteter Kohle und Polyäthylenglykol haben eine gute Übereinstimmung mit der Doppelantikörpertrennung ergeben. Der Verlauf der Standardkurven in Puffer ist für alle drei Methoden fast identisch, wenn man die unterschiedlich hohen N-Werte bei der Berechnung der Prozentzahl B/B_0 abzieht (Abb. 16). Beim Vergleich der Im-

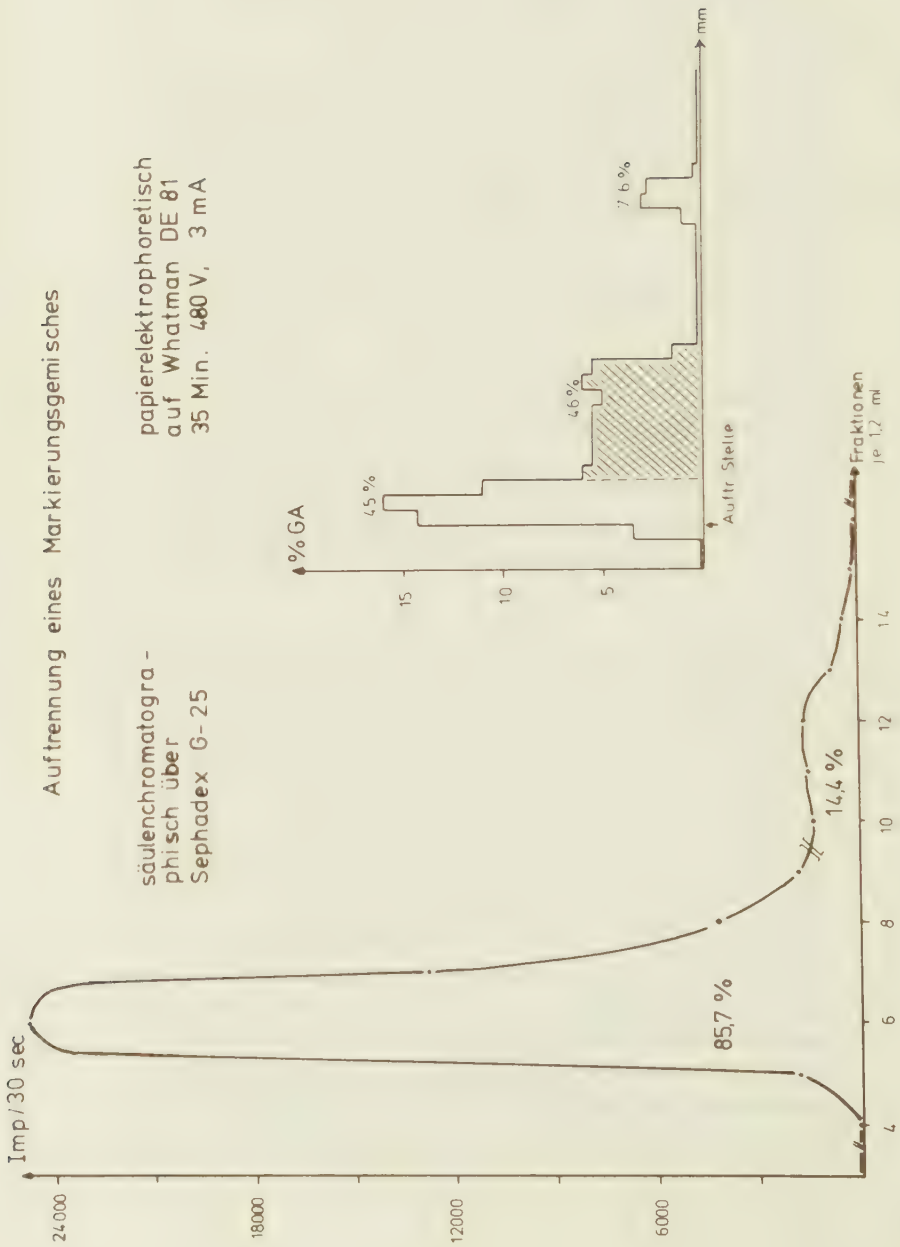


Abb. 29

pulszahlen im Antikörper ergibt sich kein Hinweis dafür, daß bei der Kohletrennung antikörpergebundenes Peptid B in größerem Umfang an die Kohle gebunden wird. Somit sind alle 3 Trennmethoden für unseren Assay einsetzbar.

Der Assay für Peptid B hat im Meßbereich keine Kreuzreaktionen mit den bekannten Hypophysenvorderlappenhormonen, von denen wir für LH, Prolactin, ACTH, FSH, STH und TSH auch Präparationen aus Schweinehypophysen prüfen konnten. Die Kreuzreaktion mit Neurophysin aus Schweinehypophysen könnte durch die unvollständige Reinigung der Neurophysinpräparation bedingt sein (Abb. 28).

Für den bisher einzigen spezifischen Lipotropin-Assay von DESRANLEAU et al. (13) steht ein spezifischer Antikörper zur Verfügung, der eine Verdünnung von 1 : 40.000 erlaubt, damit wird für den Assay eine untere Nachweisgrenze von 1 ng/ml angegeben. Im Vergleich dazu müssen wir mit einer wesentlich geringeren Antiserumverdünnung arbeiten, die untere Nachweisgrenze ist etwas niedriger. Für diesen Assay werden aber die Ergebnisse von Serum-Messungen nur für Ultrafiltrate aus 200 ml Serum berichtet, während unsere Ergebnisse aus der Messung von je 0,1 ml Nativserum stammen.

Die Lipotropin-Messungen in Humansenen im Assay von GILKES et al. (17) können nur zusammen mit MSH-Bestimmungen erfolgen, beide sind aufgrund von unterschiedlich starken Kreuzreaktionen mit Antiseren meßbar, die mit ACTH erzeugt wurden. Im Gegensatz dazu haben wir mit dem gereinigten lipotropen Peptid immunisiert und wir arbeiten nicht mit Glaskörperextrakten aus dem Serum.

Zusammenfassung

Das lipotrope Peptid B wird aus Schweinehypophysen isoliert, es hat ein Molekulargewicht von etwa 11.000.

Für den Radioimmunoassay wurden mit hochgereinigtem Peptid Antiseren in Kaninchen erzeugt. Das beste Antiserum erlaubt eine eingesetzte Verdünnung von 1 : 1.200. Die Markierung des Peptids mit Jod¹²⁵ wird nach der Chloramin T-Methode von HUNTER und GREENWOOD durchgeführt. Mit Variationen der Markierungsreaktion wurden spezifische Aktivitäten von 72 bis 325 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ erreicht.

Das Markierungsgemisch wird über Sephadex G-25 aufgetrennt und die Gipfelfraktion des Peptidpeaks über Sephadex G-50 superfine rechromatographiert. Die Elutionsfraktionen der Rechromatographie werden im Antikörperüberschuß auf ihre Bindungsfähigkeit ausgetestet. Der Tracer ist etwa 4 Wochen in der Endverdünnung bei -20°C haltbar, für eine spätere Verwendung ist eine Rechromatographie notwendig. Der Tracer wird elektrophoretisch auf dem Ionenaustauschpapier Whatman DE 81 auf den Anteil an freiem Jod und beschädigtem Peptid geprüft.

Bei der Trennung von freiem und antikörpergebundenem Antigen lassen sich die Doppelantikörpermethode, die Kohle-Dextran-Trennung und die Fällung mit Polyäthylenglykol mit gut vergleichbaren Ergebnissen einsetzen.

Der Assay hat im Meßbereich keine Kreuzreaktionen mit den geprüften bekannten Hypophysenhormonen mit Ausnahme von Neurophysin aus Schweinehypophysen, das in der Acrylamidgelelektrophorese nicht einheitlich war.

Die untere Nachweisgrenze des Assays liegt bei etwa 0,5 ng/ml. Damit ist in mehr als der Hälfte der untersuchten Schweineseren nativ kein Peptid B meßbar. Bei den übrigen liegen die meisten Ergebnisse zwischen 0,5 und 4 ng/ml.

In Extrakten aus Schweinehypophysen mit Natrium-Chlorid-Lösungen und Ammoniumhydroxid wurden je Hypophyse 1,2 bis 1,6 mg Peptid B gemessen. In einer Rinderhypophyse waren 500µg, in einer Humanhypophyse 30 µg Peptid B nachweisbar.

Literaturverzeichnis

1. AUBERT, M.L.:
Jodination and purification of polypeptide hormones.
Importance of purity analysis techniques.
Symposium on Radioimmunoassays, 7th Intern. Congr.
of Clin.Chem., Geneva-Evian, 1969, Vol. 3
Hormones, Lipids, and Miscellaneous,
Karger, Basel, 1970
2. AUBERT, M.L.:
Critical study of the radioimmunological assay for
the dosage of the polypeptide hormones in plasma.
J.Nucl.Biol.Med. 14, No. 1-3, 1970
3. BANGHAM, D.R., COTES, P.M.:
Radioimmunoassay and saturation analysis.
Standardization and Standards.
Brit.Med.Bull. 30, 12, 1974
4. BERSON, S.A., YALOW, R.S.:
Introduction to the symposium on radioimmunoassay.
General principles.
Symposium on Radioimmunoassays, 7th Intern.Congr.
of Clin.Chem., Geneva-Evian, 1969, Vol. 3
Hormones, Lipids, and Miscellaneous,
Karger, Basel, 1970.
5. BINOUX, M.A., ODEL, W.D.:
Use of the dextran-coated charcoal to separate antibody-
bound from free hormone: a critique.
J.Clin.Endocrin.Metab. 36, 303, 1973
6. BOTTERMANN, P., ERMILER, R., HENNER, J.:
A semiautomatic method for immunoassay of insulin and
human growth hormone.
Horm.Metab.Res., 3, 55, 1971
7. CHALLAND, G., GOLDIE, D., LANDON, J.:
Radioimmunoassay and saturation analysis.
Immunoassay in the diagnostic laboratory.
Brit.Med.Bull. 30, 38, 1974

8. CHRETIEN, M.:
Obesity and pituitary lipolytic hormones.
Triangle 13, 63, 1974.
9. COTES, P.M.:
Standards and reference reagents for radioimmunoassay
of peptide hormones and related substances.
Sonderdruck der International Atomic Energy Agency,
SM-117/2o5, 1973
10. CREIGHTON, W.D., LAMBERT, P.H., MIESCHER, P.A.:
Detection of antibodies and soluble antigen-antibody-
complexes by precipitation with polyethylene glycol.
J.Immunol. 111, 1219, 1973
11. CRESTO, J.C., DUJOVNE, I.L., CASTELLANI, P.J., MITTA, E.A.,
DEMAJO, S.T., FOGLIA, V.G.:
Insulin-Radioimmunoassay by the charcoal-dextran technique.
Diabetologia 8, 292, 1972
12. DESBUQUOIS, B., AURBACH, G.D.:
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-
bound peptide hormones in radioimmunoassays.
J.Clin.Endocrin. 33, 732, 1971
13. DESRANLEAU, R., GILARDEAU, C., CHRETIEN, M.:
Radioimmunoassay of ovine-beta-lipotropic hormone.
Endocrinology 91, 1004, 1972
14. EKINS, R.P.:
Radioimmunoassay and saturation analysis.
Basic principles and theory.
Brit.Med.Bull. 30, 3, 1974
15. ERHARDT, F., MARSCHNER, J., PICKARDT, R.C., SCRIBA, P.C.:
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen
Thyreotropinbestimmung.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 381, 1973
16. FELBER, J.P.:
Radioimmunoassays.
In: Clinical Biochemistry - Principles and Methods -
p. 324, Ed. Curtius, H.-C., Roth, M., Verlag de Gruyter,
Berlin 1974

17. GILKES, J.J.H., BLOOMFIELD, G.A., SCOTT, A.P., LOURY, P.J.,
RATCLIFFE, J.G., LONDON, J., REES, L.H.:
Development and validation of a radioimmunoassay for
peptides related to β -melanocyte-stimulating hormone
in human plasma: the lipotrophins.
J.Clin.Endocrin.Metab. 40, 450, 1975
18. GORDIN, A., SAARINEN, P.:
Methodological study of the radioimmunoassay of
human thyrotrophin.
Acta Endocrin. 71, 24, 1972
19. GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M., GLOVER, J.S.:
The preparation of ^{131}J -labelled human growth hormone
of high specific radioactivity.
Biochem.J. 89, 114, 1963
20. HERBERT, V., LAU, K.S., GOTTLIEB, C.W., BLEICHER, S.J.:
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J.Clin.Endocrin. 25, 1375, 1965
21. HERVAS, F., MORREALE DE ESCOBAR, G.:
A rapid procedure for the radioimmunoassay of rat
growth hormone.
Horm.Metab.Res. 6, 300, 1974
22. HILDEBRANDT-STARK, H.E., VEKEMANS, M., ROBYN, C.:
Radioimmunoassays for human chorionic gonadotrophin
and human hypophysial LH using the double antibody
method.
Horm.Res. 5, 367, 1974
23. HUNTER, W.M., GREENWOOD, F.G.:
A radio-immuno-electrophoretic assay for human growth
hormone.
Biochem.J. 91, 43, 1964
24. HUNTER, W.M.:
The preparation and assessment of iodinated antigens.
In: Kirkham, K.E. and Hunter, W.M.: Radioimmunoassay
methods, p. 3, Churchill Livingstone, Edinburgh, London,
1971

25. JOEL, E.W., SCHÖNBERG, D.K., ILG, W., KELLER, E.:
Problems of optimisation of double antibody radio-immunoassay of HLH, HFSH, and HGH.. "Hook" phenomenon, falsely negative and positive patient values, and linearity of patients plasma dilutions.
Sonderdruck der Intern.Atomic Energy Agency,
SM-177/52
26. KERET, R., MATHIASH, S., ESHET, R., BROWN, M., LEVY, J., LARON, Z.:
Repeated purification of 125 I-Jod-HGH for radioimmunoassay.
Clin.Chim.Acta 47, 21, 1973
27. KIDA, S., MULLER-EBERHARD, U.:
A radioimmunoassay employing polyethylene glycol (PEG) for measuring dilute concentrations of rat hemopexin, albumin and haptoglobin.
Immunochemistry 12, 97, 1975
28. LÖFFLER, G., WEISS, L.:
Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin.
Mitteilg. der Dtsch.Ges. f. Klin. Chem., 3, 1971
29. MARSCHNER, J., BOTTERMANN, P., ERHARDT, F., LINKE, R., LÖFFLER, G., MAIER, V., SCHWANDT, P., VOGT, W., SCRIBA, P.C.:
Group experiments on the radioimmunological insulin determination.
Horm.Met.Res. 6, 293, 1974
30. MAURER, H.R.:
Disc-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese.
DeGruyter, Berlin, 1968
31. MELANI, F., BARTELT, K.M., CONRAD, R., PFEIFFER, E.F.:
Die Jod 131 -Markierung von Insulin, ACTH und STH mit hoher spezifischer Aktivität zur Anwendung in der radioimmunologischen Methode.
Z.Klin.Chem. 4, 189, 1966
32. MIDGLEY, A.R., REBAR, R.W., NISWENDER, G.D.:
Radioimmunoassays employing double antibody techniques.
Acta Endocrinologica, Suppl. 142, 247, 1969

33. MOSER, R.J., HOLLINGSWORTH, D.R.:
Examination of some factors affecting sensitivity and reproducibility in radioimmunoassay of thyrotropin.
Clin.Chem. 21, 347, 1975
34. NARS, P.W., STAHL, M., DAMBACHER, M., BAUMANN, J., GIRARD, J.:
On the use of a peptidase inhibitor (Trasylol) for storage of J^{125} -labelled peptide hormones (HGH, TSH, ACTH, Insulin, Glucagon, PTH).
Experientia 28, 213, 1971
35. NIXON, W.E., CARGILL, C.M.:
Binding of tracer FSH, LH, GH and TSH by anti-FSH sera prepared by several immunization regimes.
J.Lab.Clin.Med. 78, 949, 1971
36. PLAYFAIR, J.H.L., HURN, B.A.L., SCHULSTER, D.:
Radioimmunoassay and saturation analysis.
Production of antibodies and binding reagents.
Brit.Med.Bull. 30, 24, 1974
37. QUABBE, H.J.:
Radioimmunologische Bestimmung von Wachstumshormon im Plasma des Menschen.
Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem. 7, 259, 1969
38. QUABBE, H.J.:
Double antibody separation technique.
Symp. on Radioimmunoassays, 7th Intern.Congr. of Clin.Chem., Geneva-Evian 1969, Vol. 3: Hormones, Lipids, Miscellaneous, p. 148, Karger, Basel, 1970
39. RATCLIFFE, J.-G.:
Radioimmunoassay and saturation analysis.
Separation techniques in saturation analysis.
Brit.Med.Bull. 30, 32, 1974
40. ROILLER, E., MALVANO, R., GANDOLFI, C., ROSA, U.:
Effect of irreversible adsorbents on the dissociation of the antigen-antibody complexes.
Horm.Metab.Res. 6, 57, 1974
41. RUSCHEWSKI, H., WEISWEILER, P., SCHWANDT, P.:
Preparation of the lipidmobilizing peptide B from pig pituitary by acrylamide-gel-electrophoresis.
Acta Endocrin. Suppl. 173, 107, 1973

42. RUSCHEWSKI, H.:
Peptid B, ein Lipotropin aus Schweinehypophysen -
Isolierung und Charakterisierung.
Dissertation, nicht publiziert.
43. SAND, T., TORJESEN, P.A.:
Dextran-coated charcoal used in the radioimmunoassay
of human pituitary luteinizing hormone.
Acta Endocrin. 73, 444, 1973
44. SCHRUMPF, E., SAND, T.:
Radioimmunoassay of gastrin with activated charcoal.
Scand.J.Gastroenterol. 7, 683, 1972
45. SCHWANDT, P.:
Special lipid mobilizing hormones from the pituitary
gland (lipotropins)
Acta Endocrin. Suppl. 173, 177, 1973
46. SCHWANDT, P., WEISWEILER, P., RUSCHEWSKI, H., HAGEN, R.,
LAMERZ, R., OTTO, J.:
Isolation, characterization and lipolytical action of
the pig pituitary lipotropins peptide A and peptide B.
Acta Endocrin. Suppl. 177, 204, 1973
47. SCHWANDT, P.:
Die Lipotropine.
Klin.Wschr. 52, 153, 1974
48. SKELLEY, D.S., BROWN, L.P., BESCH, P.K.:
Radioimmunoassay.
Clin.Chem. 19, 146, 1973
49. SKOWSKY, W.R., FISHER, D.A.:
The use of thyroglobulin to induce antigenicity to
small molecules.
J.Lab.Clin.Med. 80, 134, 1972
50. VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E., ROSS, G.T.:
A method for producing specific antisera with small doses
of immunogen.
J.Clin.Endocrin. 33, 988, 1971

51. WEIR, G.C., TURNER, R.C., MARTIN, D.B.:
Glucagon radioimmunoassay using antiserum 3o K:
Interference by plasma.
Horm.Metab.Res. 5, 241, 1973
52. WEISWEILER, P.:
Darstellung und Eigenschaften lipolytisch wirksamer
Polypeptide aus Hypophysen von Schwein und vom Menschen.
Dissertation, München, 1971
53. WEISWEILER, P., SCHWANDT, P.:
Untersuchungen zur lipolytischen Aktivität von TSH.
Klin.Wschr. 52, 297, 1974
54. WEISWEILER, P., SCHWANDT, P.:
Biological action of the lipotrophic peptides A and B
from pig pituitary glands.
Acta Endocrin. 79, 34, 1975
55. YALOW, R.S., BERSON, S.A.:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.Clin.Invest. 39, 1157, 1960
56. YALOW, R.S.:
Radioimmunoassay - practices and pitfalls.
Suppl. I to Circulation Res. 32 and 33, 116, 1973
57. YALOW, R.S.:
Complexity of immunoreactive forms of peptide hormones
in plasma and in tissue extracts.
Israel J.Med.Sci. 10, 1185, 1974

Lebenslauf

Am 7.8.1938 wurde ich als Tochter des Inspektors Adalbert Neureuther und seiner Frau Ottilie in Marktoberdorf im Allgäu geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Marktoberdorf und schloß dort 1955 die Mittelschule ab. Anschließend verbrachte ich ein Jahr als Austauschschülerin in Fremont, Ohio, USA. Nach der Ausbildung zur Landwirtschaftslehrerin arbeitete ich von 1961 bis 1963 an verschiedenen landwirtschaftlichen Berufsschulen in Oberbayern. Danach arbeitete ich zwei Jahre in Kinderheimen in München.

Ab Oktober 1965 besuchte ich das Münchenkolleg und legte dort im März 1968 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1968 begann ich das Medizinstudium an der Universität München, im Dezember 1973 habe ich hier das Medizinische Staatsexamen abgeschlossen.

Nach der Ableistung der Medizinalassistentenzeit an der I. Medizinischen Klinik der Universität München und der Chirurgischen Klinik Dr. Rinecker wurde mir im April 1975 die Approbation erteilt. Seit 1. April 75 arbeite ich als wissenschaftliche Angestellte beim Sonderforschungsbereich 51.

